ORSAY
n° d'ordre : 1765

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

par

Danièle KERBIRIOU

Sujet de la Thèse :

ETUDE DES PROPRIETES DE REGULATION DE L'ASPARTATE TRANSCARBAMYLASE DE ESCHERICHIA COLI, APRES ABOLITION SELECTIVE DES INTERACTIONS HOMOTROPES COOPERATIVES

Soutenue le 15 Décembre 1976, devant la Commission d'Examen

Mlle	J. YON	Présidente
MM.	J.C. PATTE	Examinateurs
	P. FROMAGEOT	
	F. SEYDOUX	
	G. HERVE	

T H E S E

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS-SUD

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

par

Danièle KERBIRIOU

Sujet de la Thèse :

ETUDE DES PROPRIETES DE REGULATION DE L'ASPARTATE TRANSCARBAMYLASE DE ESCHERICHIA COLI, APRES ABOLITION SELECTIVE DES INTERACTIONS HOMOTROPES COOPERATIVES

Soutenue le 15 Décembre 1976, devant la Commission d'Examen

Mlle	J. YON	Présidente
MM.	J.C. PATTE	Examinateurs
	P. FROMAGEOT	
	F. SEYDOUX	
	G. HERVE	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A Grand-mère,

A mes Parents,

A Léna.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548102_0029

Ce travail a été effectué dans sa majeure partie dans le Service de Biochimie du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay que dirige Monsieur Pierre FROMAGEOT, et poursuivi dans le Laboratoire d'Enzymologie du Centre National de la Recherche Scientifique de Gif-sur-Yvette que dirige Monsieur Jekisiel SZULMAJSTER.

Je remercie Monsieur Jean COURSAGET de m'avoir accueillie dans le Département de Biologie à Saclay, où j'ai pu bénéficier de moyens exceptionnels.

J'exprime ma très profonde gratitude à Guy HERVE qui m'a appris à concevoir de la manière la plus rigoureuse les démarches à suivre pour mener à bien un travail de recherche. Pour son enseignement patient, pour ses conseils et ses encouragements sans cesse prodigués tout au long de mes années de travail, je lui témoigne ici toute ma reconnaissance.

Je remercie vivement Claire LECONTE et Mademoiselle Florence LEDERER pour leur contribution à l'analyse de la composition en acides aminés de la 2-ThioU-ATCase, Maryse POIRET pour la réalisation des cartes peptidiques et Gérard BATELIER pour les analyses par ultracentrifugations. A John GRIFFIN (+), venu tout spécialement des Etats-Unis pour réaliser les études par spectroscopie de dichroïsme circulaire avec nous, je dois mon initiation aux techniques spectrophotométriques et lui exprime ma sincère reconnaissance. Je remercie Monsieur Jean-Louis FOURREY de m'avoir donné du 4-thiouracile par lui synthétisé.

Ma reconnaissance va également à tous les membres du Service de Biochimie de Saclay et du Laboratoire d'Enzymologie du C.N.R.S. parmi lesquels j'ai connu une atmosphère d'amitié et de collaboration que je ne pourrai oublier. Je remercie en particulier Paul GUEGUEN et Bernard PERBAL pour leurs conseils et leur amicale présence tout au long de mon séjour à Saclay.

Je suis très honorée que Mademoiselle Jeanine YON, dont l'enseignement est à la base de mes connaissances en enzymologie et qui a suivi ce travail tout au long de son élaboration, ait accepté de présider ce jury.

Je remercie Messieurs Jean-Claude PATTE, Pierre FROMAGEOT et François SEYDOUX d'avoir accepté d'examiner cette thèse et d'avoir bien voulu, avec Guy HERVE, composer mon jury.

(+) Adresse actuelle : Scripps Clinic and Research Foundation
La Jolla - California - U.S.A.

Ce travail a fait l'objet des publications suivantes :

- Biosynthesis of an Aspartate Transcarbamylase Lacking Cooperative Interactions. 1. Disconnection of Homotropic and Heterotropic Interactions under the influence of 2-Thiouracil.
  Danièle KERBIRIOU and Guy HERVÉ.
  J. Mol. Biol. (1972), 64, 379-392.

- Biosynthesis of an Aspartate Transcarbamylase Lacking Homotropic Cooperative Interactions.
  Danièle KERBIRIOU and Guy HERVÉ.
  IV International Biophysics Congress. Moscou (1972), 2, 98.

- Dissociation des Interactions Homotropes et Hétérotropes dans l'Aspartate Transcarbamylase de Escherichia coli.
  Danièle KERBIRIOU.
  Thèse de 3ème Cycle, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 14 Février 1973.

- Disconnection of Homotropic and Heterotropic Interactions in E. coli Aspartate Transcarbamylase.
  Guy HERVÉ and Danièle KERBIRIOU.
  XI Journées Biochimiques Latines, Salamanque (1973), d 108.

- An Aspartate Transcarbamylase Lacking Catalytic Subunit Interactions. II. Regulatory Subunits are Responsible for the lack of Cooperative Interactions between Catalytic Sites. Drastic Feedback Inhibition does not Restore these Interactions.
  Danièle KERBIRIOU and Guy HERVÉ.
  J. Mol. Biol. (1973), 78, 687-702.

- Two kinds of Sites Bind CTP in 2-ThioU-Aspartate Transcarbamylase.
  Danièle KERBIRIOU and Guy HERVÉ
  9th FEBS Meeting, Budapest (1974), 79.

- An Aspartate Transcarbamylase Lacking Catalytic Subunit Interactions. III. Study of the Conformational Changes by Ultraviolet Absorbance and Circular Dichroism Spectroscopy.
  Danièle KERBIRIOU and Guy HERVÉ.
  John H. GRIFFIN.
  Submitted to J. Biol. Chem., (1976).

ABREVIATIONS

ATCase	: Aspartate transcarbamylase.
Sous-unités catalytiques	: Sous-unités catalytiques obtenues par dissociation de l'ATCase.
Sous-unités régulatrices	: Sous-unités régulatrices obtenues par dissociation de l'ATCase.
C	: Chaîne catalytique.
R	: Chaîne régulatrice.
2-ThioU-ATCase	: Aspartate transcarbamylase synthétisée en présence de 2-thiouracile.
Sous-unités 2-ThioU-catalytiques	: Sous-unités catalytiques obtenues par dissociation de la 2-ThioU-ATCase.
Sous-unités 2-ThioU-régulatrices	: Sous-unités régulatrices obtenues par dissociation de la 2-ThioU-ATCase.
PHMB	: Parahydroxymercuribenzoate.
SDS	: Dodécylsulfate de sodium.
Tris	: Tris-hydroxyméthyl-aminométhane.
EDTA	: Acide éthylène-diamine-tétracétique.
CTP	: Cytidine triphosphate.
ATP	: Adénosine triphosphate.
ARN	: Acide ribonucléique.
DEAE-Séphadex	: Diéthyl-amino éthyl-Séphadex.
PALA	: N-(phosphonacétyl)-L-aspartate.

TABLE DES MATIERES

Page

CHAPITRE I - INTRODUCTION 1

CHAPITRE II - MATERIELS ET METHODES 17

- Matériels 18
- Méthodes 19

1 - Source bactérienne 19
2 - Culture des bactéries - Conditions de dérépression 19
3 - Purification des enzymes 20
4 - Dissociation de l'ATCase et de la 2-ThioU-ATCase en sous-unités 21
5 - Reconstitution des enzymes homologues et hétérologues à partir des sous-unités catalytiques et régulatrices isolées ... 22
6 - Détermination de l'activité enzymatique 22
7 - Electrophorèses sur gel de polyacrylamide 24
8 - Analyses par centrifugations 26
9 - Spectroscopie de dichroïsme circulaire 26
10 - Spectroscopie d'absorption 27
11 - Dialyses à l'équilibre en présence de CTP 29
12 - Analyses du contenu en acides aminés 32
13 - Détermination du contenu en zinc 33

CHAPITRE III - RESULTATS 35

1 - La 2-thiouracile aspartate transcarbamylase, normalement constituée de chaînes régulatrices et catalytiques, se comporte vis-à-vis de certaines propriétés comme des sous-unités catalytiques isolées 37

1.1 - Les molécules d'aspartate transcarbamylase synthétisées en présence de 2-thiouracile sont des enzymes natifs modifiés et non des sous-unités catalytiques libres 41

1.2 - Vis-à-vis de certaines propriétés, la 2-ThioU-ATCase se comporte comme des sous-unités catalytiques isolées 63

1.3 - Abolition des interactions homotropes coopératives entre molécules d'aspartate 72

2 - La 2-thouracile-aspartate transcarbamylase est un enzyme sensible aux effecteurs allostériques 89

2.1 - L'activité de la 2-ThioU-ATCase est inhibée par le CTP 93

2.2 - L'activité de la 2-ThioU-ATCase est stimulée par l'ATP 123

3 - Les propriétés des sous-unités catalytiques et celles des sous-unités régulatrices sont modifiées dans la 2-thiouracile-aspartate transcarbamylase 129

3.1 - Les sous-unités catalytiques sont responsables de l'altération des propriétés spectroscopiques et de la diminution de l'activité spécifique dans la 2-ThioU-ATCase 133

3.2 - Les sous-unités régulatrices sont responsables de la perte des interactions coopératives entre sites catalytiques pour l'aspartate dans la 2-ThioU-ATCase 168

4 - Changements conformationnels dus à la liaison des substrats à la thiouracile-aspartate transcarbamylase 185

4.1 - Etude des changements conformationnels par spectroscopie de dichroïsme circulaire 189

4.2 - Etude des changments de conformation par spectroscopie d'absorption en ultra-violet 195

5 - Etude de la nature chimique de la modification provoquée par le 2-thiouracile 203

5.1 - Le 2-thiouracile doit être présent au cours de la biosynthèse de l'ATCase pour que l'enzyme soit modifié 206

5.2 - L'influence du 2-thiouracile sur le taux de synthèse et les propriétés de l'ATCase dépend de sa concentration dans le milieu de dérépression 219

5.3 - Fonctions chimiques du 2-thiouracile essentielles à l'obtention de la 2-ThioU-ATCase 232

5.4 - La 2-ThioU-ATCase n'est pas un enzyme déficient en zinc 247

5.5 - Composition en acides-aminés de la 2-ThioU-ATCase et de ses sous-unités 251

CHAPITRE IV - DISCUSSION

1 - Les interactions hétérotropes négatives entre les sites catalytiques et régulateurs sont dissociables des interactions homotropes 265

2 - L'état conformationnel des sous-unités régulatrices joue un rôle essentiel dans les interactions homotropes entre sites catalytiques 268

3 - L'état conformationnel des sous-unités régulatrices conditionne l'efficacité de la rétroinhibition 271

4 - Les interactions hétérotropes positives entre les sites catalytiques et régulateurs peuvent se manifester en l'absence des interactions homotropes 274

5 - Les changements conformationnels dus à la liaison des substrats peuvent être normalement observés en l'absence d'interactions homotropes 280

6 - Nature de la modification chimique provoquée par le 2-thiouracile 286

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 289

SOMMAIRE 300

CHAPITRE I

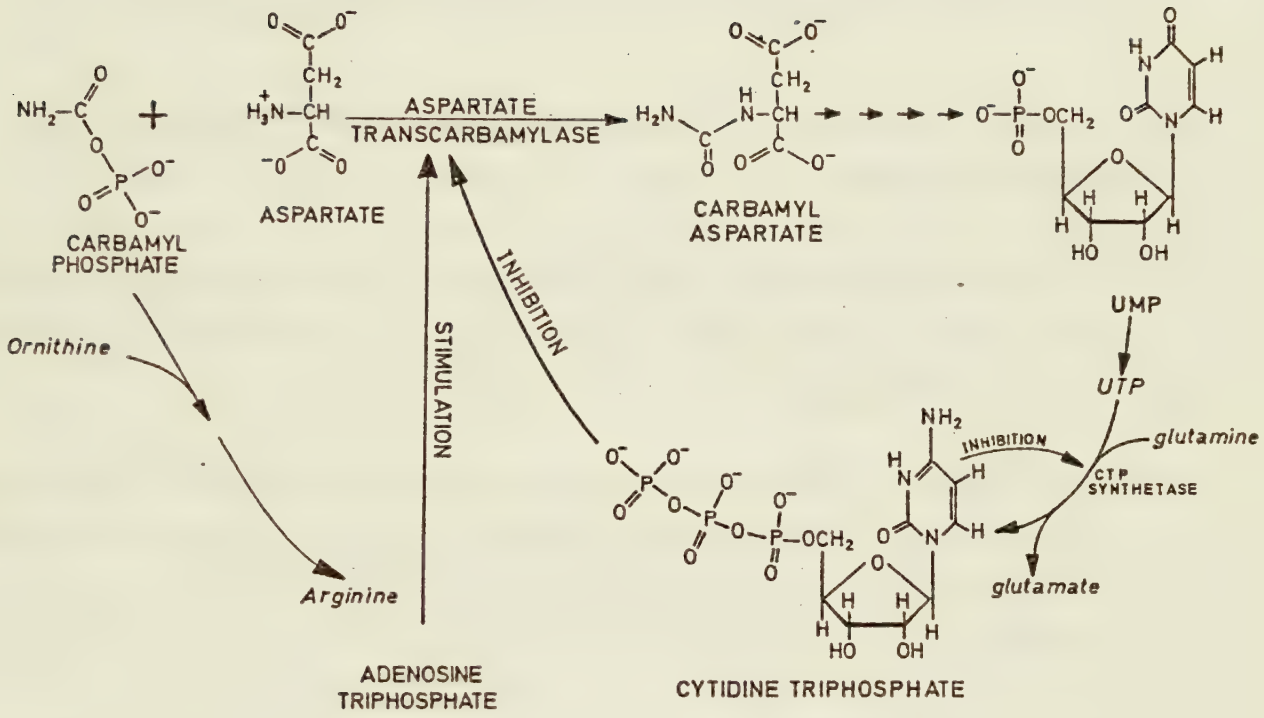
INTRODUCTION

L'aspartate transcarbamylase de Escherichia coli (carbamoyl phosphate : L-aspartate carbamoyl transférase E.C. 2.1.3.2.) catalyse la condensation du carbamyl phosphate et du L-aspartate pour la formation de carbamyl-L-aspartate. Cette réaction est la première étape dans la voie de biosynthèse des nucléotides pyrimidiques. L'aspartate transcarbamylase (ATCase) dont l'activité est, d'une part, rétroinhibée par la cytidine triphosphate (CTP), produit final de la voie des pyrimidines / 1 /, et, d'autre part, stimulée par l'adénosine triphosphate (ATP), produit de la voie parallèle de biosynthèse des nucléotides puriques / 2 /, contribue substantiellement au contrôle de la synthèse des pyrimidines. La figure 1 illustre ce processus selon lequel le CTP inhibe l'étape initiale de sa propre voie de biosynthèse, et limite en conséquence sa propre production.

L'ATCase de Escherichia coli diffère des autres protéines régulatrices par le fait qu'elle est dissociable en deux espèces de sous-unités : "les sous-unités catalytiques" qui possèdent l'activité catalytique, mais sont insensibles aux nucléotides effecteurs, et les "sous-unités régulatrices", qui sont dépourvues d'activité catalytique mais possèdent les sites de liaison de ces nucléotides. Dans des conditions appropriées, les deux types de sous-unités peuvent se réassocier pour reformer un enzyme natif, pleinement actif et rétroinhibable / 3 /. L'enzyme natif est fait de l'association de six chaînes catalytiques et six chaînes régulatrices / 4 , 5 , 6 , 7 , 8 /. Ces deux types de chaînes sont des espèces polypeptidiques complètement distinctes / 9 /. Les sous-unités catalytiques sont des trimères de chaînes catalytiques identiques, chacune ayant un poids moléculaire de 33 000 daltons, et les sous-unités régulatrices sont des dimères de chaînes régulatrices identiques, chacune ayant un poids moléculaire de 17 000 daltons / 4 , 5 , 6 , 8 , 10 /. La molécule d'ATCase contient six atomes de zinc dont la présence est nécessaire à l'association des sous-unités régulatrices et catalytiques et au maintien de la structure quaternaire

FIGURE 1

Régulation métabolique de l'activité de l'aspartate transcarbamylase chez Escherichia coli.


CARBAMYL PHOSPHATE
ASPARTATE
ASPARTATE TRANSCARBAMYLASE
CARBAMYL ASPARTATE
UMP
UTP
glutamine
glutamate
CTP SYNTHETASE
INHIBITION
Ornithine
Arginine
STIMULATION
INHIBITION
ADENOSINE TRIPHOSPHATE
CYTIDINE TRIPHOSPHATE

/ 8 , 11 /. Après dissociation de l'enzyme, les atomes de zinc demeurent associés aux sous-unités régulatrices, probablement au niveau des groupes sulfhydriles / 12 , 13 /. Les études cristallographiques ont montré que la molécule native présente une symétrie d'ordre 3, et que les sous-unités sont organisées de telle façon que les deux trimères de chaînes catalytiques sont situées de part et d'autre d'une ceinture équatoriale constituée des trois dimères de chaînes régulatrices / 5 , 14 , 15 , 16 , 17 /. Ces résultats coïncident avec ceux qui ont été obtenus par l'utilisation de méthodes chimiques ou par microscopie électronique / 8 , 10 , 18 /.

L'ATCase présente les deux sortes d'interactions caractéristiques des enzymes allostériques :

- Les interactions homotropes coopératives entre sites de liaison du substrat aspartate, qui se traduisent par une relation sigmoïdale entre vitesses initiales et concentrations en substrat.

- Les interactions hétérotropes, soit négatives entre sites de liaison du substrat et du rétroinhibiteur, soit positives entre sites de liaison du substrat et de l'activateur, qui permettent le contrôle de l'activité par fixation des effecteurs sur les sites régulateurs.

Pour rendre compte de la coexistence de ces deux types d'interactions dans les enzymes oligomériques rétroinhibables, deux types de modèles ont été proposés :

a) Le modèle "concerté" de MONOD, WYMAN, CHANGEUX / 19 / postule qu'en absence de tout ligand, ces enzymes se présentent sous la forme d'un équilibre entre deux conformations possédant des affinités différentes pour les substrats et effecteurs. Ceux-ci agissent en déplaçant l'équilibre vers la forme pour laquelle ils ont une affinité maximum. La caractéristique essentielle de ce modèle est que le changement de conformation est concerté, simultané pour toutes les sous-unités constitutives d'une même molécule d'enzyme.

b) Le modèle "séquentiel" de KOSHLAND, NEMETHY et FILMER / 20 / postule qu'en absence de ligand, l'enzyme se trouve sous une forme unique, possédant une affinité faible pour celui-ci. La fixation de ce ligand sur un site entraîne un changement de conformation localisé, facilitant sa fixation sur les sites voisins. Ainsi de proche en proche la molécule d'enzyme atteint la conformation possédant l'affinité maximum pour ce ligand (effets homotropes positifs). Ce modèle permet également d'expliquer une diminution progressive de l'affinité des sites au fur et à mesure de leur saturation (effets homotropes négatifs).

Les premières données sur les propriétés coopératives de l'ATCase furent quantitativement accordées au modèle "concerté" par CHANGEUX et RUBIN / 21 /. Plus récemment, il a été démontré que l'ATCase présente plus de deux états conformationnels selon un modèle dans lequel un changement de conformation "concerté" de la structure quaternaire se superposerait à des changements de structure tertiaire localisés et indépendants, donnant naissance à des conformations "hybrides" de l'enzyme / 11 , 22 , 23 /.

GERHART et PARDEE / 2 / par traitement de l'ATCase par la chaleur, l'urée, ou par incubation en présence d'ions de métaux lourds ont obtenu une "désensibilisation" de l'enzyme, qui perdait ainsi simultanément les deux types d'interactions. Il a été démontré que ces traitements dissociaient l'enzyme en ses sous-unités / 8 , 12 , 24 /, de telle sorte que les sous-unités catalytiques devenaient insensibles aux nucléotides effecteurs d'une part, et ne manifestaient plus de coopérativité pour la fixation de l'aspartate d'autre part. L'importance de l'intégrité de la structure quaternaire de l'ATCase pour l'existence de ces deux types d'interactions était alors établie.

Le processus de dissociation rompt l'organisation de la molécule native a deux niveaux :

- d'une part, au niveau des interactions directes entre sous-unités catalytiques et régulatrices ;

- d'autre part, au niveau des interactions entre les deux sous-unités catalytiques indirectement liées par l'intermédiaire des sous-unités régulatrices.

La perte des interactions homotropes entre sites catalytiques consécutive à la dissociation pouvait alors résulter de la perte de l'un, de l'autre, ou des deux niveaux d'organisation ainsi définis. C'est-à-dire que, selon une première hypothèse, la rupture des liaisons R : C abolirait les contraintes exercées par les seules sous-unités régulatrices sur une sous-unité catalytique dont la structure deviendrait la plus affine pour le substrat ; tandis que, selon une seconde hypothèse, la perte des interactions homotropes résulterait de la suppression des contraintes exercées par une sous-unité catalytique sur la seconde par l'intermédiaire des sous-unités régulatrices.

Ces deux hypothèses ont été examinées par l'étude de formes moléculaires incomplètes en nombre de chaînes / 25 , 26 , 27 , 28 , 29 /, ou par l'étude de molécules "hybrides" reconstituées à partir de chaînes régulatrices ou catalytiques chimiquement modifiées / 30 , 31 , 32 /. Ces études ont toutes souligné que l'existence d'interactions entre les deux sous-unités catalytiques par l'intermédiaire de sous-unités régulatrices fonctionnelles est nécessaire à la coopérativité de liaison du substrat aspartate et à la rétroinhibition. En effet, tandis que le complexe C_3R_6 ne présente plus les effets homotropes et est insensible aux effecteurs allostériques / 25 /, les espèces incomplètes en chaînes régulatrices du type C_6R_4 / 27 , 28 , 29 / sont l'objet d'interactions homotropes et d'interactions hétérotropes bien que moins intenses que dans la forme intacte C_6R_6. D'autre part, tandis que les molécules d'ATCase dont les chaînes régulatrices ont été succinylées / 31 / sont totalement dépourvues de propriétés allostériques, les molécules "hybrides" reconstituées à partir de sous-unités régulatrices normales et succinylées manifestent, proportionnellement au nombre de sous-unités normales, ces propriétés. Enfin, la molécule d'ATCase contenant un trimère de chaînes catalytiques inactives et incapables de lier le succinate, analogue du substrat aspartate, mais capables de lier le carbamyl phosphate, est l'objet au niveau des sites normalement actifs de l'autre trimère de chaînes catalytiques des interactions homotropes et hétérotropes / 30 /. De plus, ces deux types d'interactions

se manifestent encore lorsque l'ATCase possède deux seules chaînes catalytiques normales sur les six chaînes contenues par l'enzyme, que ces deux chaînes soient dans une même sous-unité ou dans deux sous-unités différentes / 32 /.

Ainsi la perte des interactions homotropes était-elle associée à celle des interactions hétérotropes dans l'ensemble des cas qui viennent d'être évoqués.

Une étude de l'effet de certains analogues de pyrimidines sur les taux de dérépression des différents enzymes de la voie de synthèse des pyrimidines avait conduit en 1962 BECKWITH, PARDEE, AUSTRIAN et JACOB / 33 / à remarquer que l'aspartate transcarbamylase synthétisée en présence de 4-hydroxy-2-mercapto-pyrimidine ou "2-thiouracile" était anormale. Il nous est apparu que l'enzyme synthétisé dans ces conditions se comportait vis-à-vis de certaines propriétés comme des sous-unités catalytiques isolées. Dans le but d'entreprendre une étude sur le mécanisme de synthèse de l'enzyme, nous avons examiné si en présence de 2-thiouracile sont synthétisées les seules sous-unités catalytiques ou si les sous-unités catalytiques et régulatrices sont toutes deux normalement synthétisées mais incapables de s'associer.

Il nous est apparu que l'activité aspartate transcarbamylase obtenue durant la dérépression en présence de 2-thiouracile n'est pas due à l'existence de sous-unités catalytiques libres, mais à celle d'un enzyme natif, normalement constitué des deux espèces de chaînes catalytiques et régulatrices. Cependant les interactions homotropes entre sites catalytiques pour la fixation de l'aspartate ont disparu dans cet enzyme, dont le comportement est, vis-à-vis de cette propriété, analogue à celui des sous-unités catalytiques isolées ou des enzymes "désensibilisés" précédemment décrits. Mais contrairement à ces espèces enzymatiques, l'aspartate transcarbamylase synthétisée en présence de 2-thiouracile, que nous appellerons "2-ThioU-ATCase" demeure l'objet d'interactions hétérotropes entre les sites catalytiques et régulateurs.

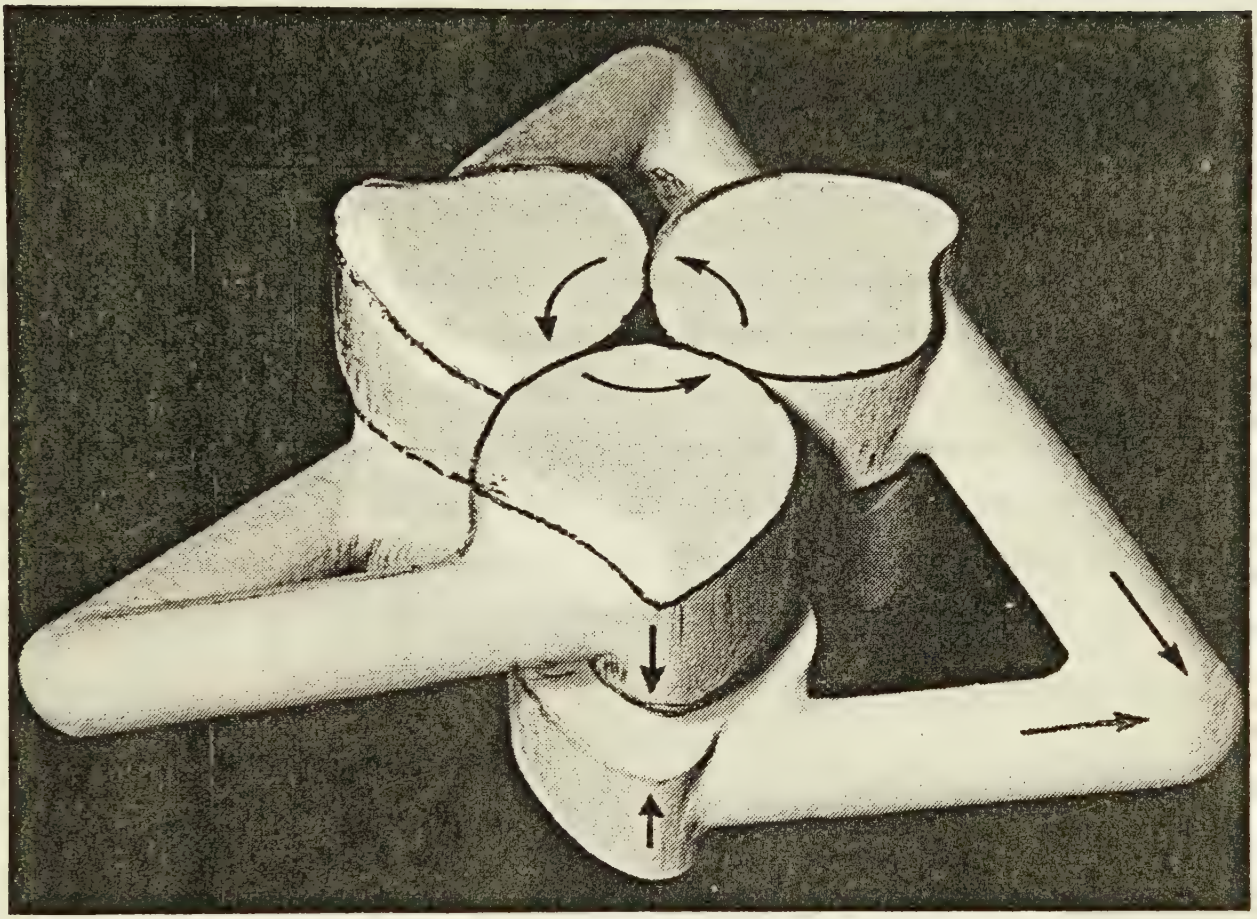
Bien que les interactions homotropes soient absentes dans la 2-ThioU-ATCase, l'enzyme est l'objet de changements conformationnels liés aux modifications de contraintes entre sous-unités provoquées par la fixation des substrats. Ces changements conformationnels ont été analysés dans la 2-ThioU-ATCase comparativement à l'ATCase, et ont montré l'existence d'interactions entre sous-unités catalytiques et régulatrices dissociables des interactions responsables des effets homotropes coopératifs.

La 2-ThioU-ATCase s'est donc révélée être un outil particulièrement utile à l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions homotropes et hétérotropes.

Enfin, un certain nombre de renseignements ont été obtenus concernant la nature de la modification chimique provoquée par le 2-thiouracile.

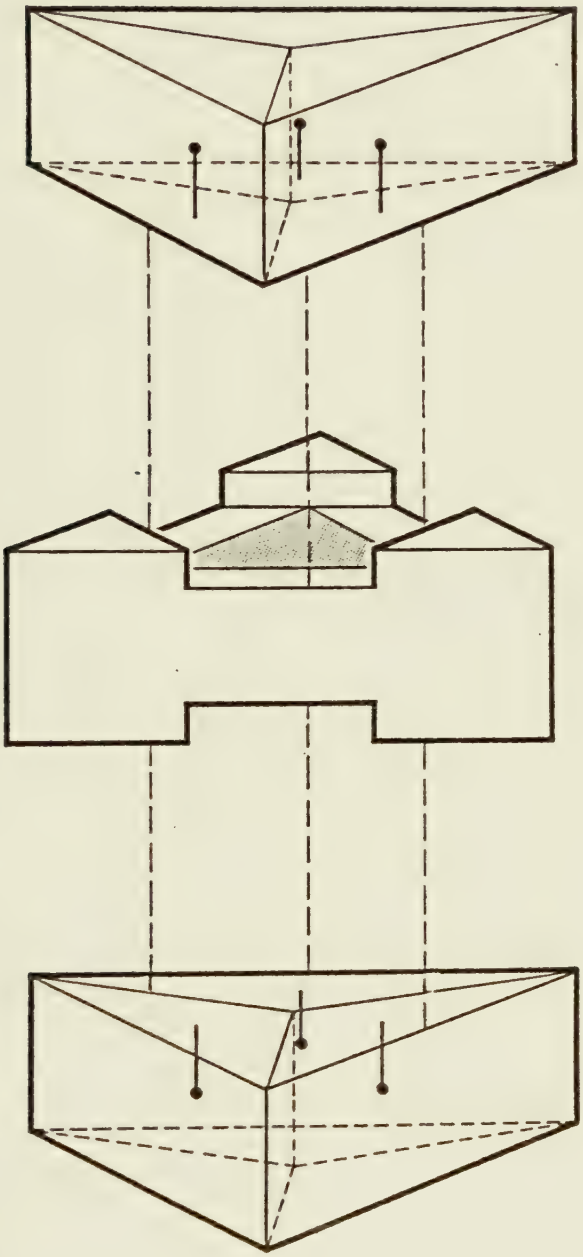
Arrangement des chaînes polypeptidiques dans l'ATCase

Modèle décrit par SCHACHMAN / 10 / selon lequel les deux sous-unités catalytiques constituées chacune de trois chaînes polypeptidiques de formes assymétriques son associées par l'intermédiaire de trois sous-unités régulatrices. Chaque sous-unité régulatrice est représentée selon une paire de chaînes régulatrices cylindriques, formant entre elles un angle aigu. Les distances réelles entre les sous-unités et le volume de la molécule native ont été plus précisément définis par LIPSCOMB / 17 /.



Modèle tridimensionnel de l'ATCase.

Vue schématique de la molécule d'ATCase développée selon l'axe de symétrie d'ordre 3. La région centrale est occupée par les trois dimères de chaînes régulatrices. Au-dessus et au-dessous de cette région apparaissent les deux trimères de chaînes catalytiques. La molécule a une longueur de 90 Å selon l'axe de symétrie d'ordre 3 et de 110 Å selon l'axe de symétrie d'ordre 2. Elle possède une cavité centrale ombrée d'environ 25 Å selon l'axe de symétrie d'ordre 3 et 50 Å selon l'axe de symétrie d'ordre 2. D'après LIPSCOMB / 17 /.



CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS

Carbamylphosphate	Fluka
Aspartate, histidine	Fluka
Uracile	Serlabo
2-thiouracile	Cyclo Chemicals
CTP	P.L. Biochemicals
ATP	Sigma
Sérum albumine bovine	Sigma
2-amino-2-méthyl-1,3 propandiol	Fluka
Acide cacodylique	Prolabo
^{14}C-Aspartate	Service de Biochimie - C.E.N. Saclay
^{3}H-CTP	Amersham
2-C^{14}-2-thiouracile	Amersham
N-(phosphonacétyl)-L-aspartate	Synthétisé par Georges STARK et Kim COLLINS (Stanford)
4-thiouracile	Synthétisé par J.L. FOURREY.

METHODES

1 - SOURCE BACTERIENNE

Le mutant de Escherichia coli, partiellement auxotrophe pour l'uracile, utilisé dans ces expériences pour la production de l'enzyme, a été généreusement fourni par le Docteur J. GERHART, Berkeley, Californie. Ce mutant, décrit par GERHART et HOLOUBEK / 34 /, possède une faible capacité à synthétiser les pyrimidines en raison d'une mutation au niveau de l'orotidylate décarboxylase, cinquième enzyme de la voie de biosynthèse des pyrimidines, et est diploïde pour la région du génôme contenant les cistrons codant pour l'ATCase.

En absence de pyrimidines exogènes, la croissance est lente et la synthèse de l'ATCase est soumise aux conditions de dérépression.

2 - CULTURE DES BACTERIES - CONDITIONS DE DEREPRESSION

Le mutant a été cultivé dans les conditions décrites par GERHART et HOLOUBEK / 34 /, en présence de 30 µg d'uracile par ml afin d'obtenir les cellules réprimées, et en présence de 4 µg par ml ou en absence d'uracile afin de provoquer la dérépression pour la biosynthèse de l'aspartate transcarbamylase.

Dans ces conditions, après trois heures de croissance, l'uracile présent est épuisé et en conséquence, dans les cellules ainsi soumises aux conditions de dérépression, l'ATCase est synthétisée. Le 2-thiouracile est ajouté au milieu de culture au moment de la dérepression pour l'obtention d'enzyme synthétisé en présence de ce composé.

En sept heures d'incubation, la densité optique (suivie à 546 nm au spectrophotomètre Eppendorf), est passée de 0,060 à 0,300. Les cellules ont été alors recueillies, resuspendues dans un même volume de tampon phosphate de potassium 0,04 M, pH 7, et traitées trois fois 30 secondes par le sonicateur Biosonic III (20 Kcyl sec). L'activité en ATCase des extraits a alors été déterminée. La turbidité (à 546 nm) des cellules en cultures était suivie à l'aide d'un spectrophotomètre Eppendorf. 0,5 unité de densité optique correspond à 7.10^8 bactéries par ml.

Dans le cas où l'activité et les propriétés de l'ATCase ont été déterminées après la dérépression en présence de $\left[2\text{-}C^{14}\right]$ -2-thiouracile 10^{-3} M, 250 µl de la suspension de bactéries ont été prélevés et les cellules ont été perméabilisées dans le but d'éliminer le $\left[2\text{-}C^{14}\right]$ -2-thiouracile intracellulaire libre. Les cellules ont été perméabilisées par addition à la suspension de 50 µl de toluène 10 % (0,18 M final). Cet aliquote a été dialysé contre deux fois 1 litre de tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 7,0, β-mercapto éthanol 2 mM, puis testé pour l'activité et les propriétés de l'enzyme dans les conditions standards. L'efficacité de la perméabilisation a été contrôlée par comparaison des activités spécifiques et des propriétés de la 2-ThioU-ATCase biosynthétisée en présence de 2-thiouracile 10^{-3} M dans deux extraits cellulaires parallèlement soniqués et perméabilisés.

3 - PURIFICATION DES ENZYMES

L'ATCase normale purifiée a été préparée selon GERHART et HOLOUBEK / 34 /. La 2-ThioU-ATCase étant plus thermolabile, lors de la purification de cet enzyme, l'étape de thermodénaturation à pH élevé et à haute force ionique a été

réalisée à 55°C au lieu de 75°C. Il avait été vérifié que dans ces conditions le même degré de purification était atteint.

4 - DISSOCIATION DE L'ATCase ET DE LA 2-ThioU-ATCase EN SOUS-UNITES

L'ATCase et la 2-ThioU-ATCase ont été dissociées par le parahydroxy-mercuribenzoate de sodium (PHMB) selon la méthode de GERHART et HOLOUBEK / 34 /. Les échantillons de 10 ml d'enzymes contenant 100 mg de protéines (0,03 mM en ATCase) ont été dialysés une nuit à 4°C contre 200 ml de tampon Phosphate de Potassium 0,04 M, pH 7,0, afin de réduire la concentration en β-mercaptoéthanol, et en EDTA.

Les enzymes dialysés ont ensuite été ajoutés à 0,5 ml d'une solution de PHMB de sodium préalablement dissous dans un tampon Tris-HCl 0,035 M, pH 8,5, pour obtenir une molarité finale en PHMB de 1,7 mM. Après une incubation de 1 heure à la température du laboratoire, 1 ml de KCl 3 M a été ajouté pour obtenir une concentration finale de 0,26 M. La solution ainsi obtenue a alors été déposée sur une colonne de DEAE-Séphadex A-50 (35 cm x 2 cm) et la séparation a été réalisée selon la technique de GERHART et HOLOUBEK / 34 /. Les solutions concentrées de sous-unités catalytiques obtenues à partir des deux enzymes ont été conservées dans le tampon Phosphate de Potassium 0,04 M, pH 7 , β-mercaptoéthanol 2 mM / 34 /. Les solutions concentrées de sous-unités "zinc-régulatrices" provenant des deux enzymes ont été préparées selon NELBACH, PIGIET, GERHART et SCHACHMAN / 13 / et conservées dans la tampon Tris-acétate 0,04 M, pH 8 ; β-mercaptoéthanol 2 mM, acétate de zinc 0,4 mM.

5 - RECONSTITUTION DES ENZYMES HOMOLOGUES ET HETEROLOGUES A PARTIR DES SOUS-UNITES CATALYTIQUES ET REGULATRICES ISOLEES

Dans chacun des cas, la réassociation des sous-unités catalytiques et régulatrices a été réalisée de la façon suivante : 0,5 mg de sous-unités catalytiques normales ou modifiées et 0,5 mg de sous-unités "zinc-régulatrices" normales ou modifiées ont été mélangées dans un volume total de 0,35 ml en présence de β-mercaptoéthanol (2 mM). Le mélange a été incubé 20 minutes à 37°C. Les enzymes ainsi reconstitués ont été analysés par électrophorèse sur gels de polyacrylamide selon la méthode décrite ci-après, et testés pour leurs propriétés enzymatiques après une dilution de 250 fois dans un tampon Phosphate de Potassium 0,04 M, pH 7.

6 - DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

6.1 - Conditions Standards

L'activité enzymatique des différentes préparations a été déterminée d'après la méthode de PORTER, MODEBE et STARK / 35 / basée sur la séparation à pH acide de l'aspartate et de ses dérivés N-substitués, ayant perdu leur charge positive. Selon les conditions légèrement différentes décrites par PERBAL et HERVE / 36 /, dans un volume total de 300 µl, le $[^{14}C]$-aspartate 20 mM (de radioactivité spécifique 0,15 mCi/mmole), le carbamyl phosphate 5 mM, dans le tampon Tris-acétate 50 mM, pH 8, et l'enzyme ou l'extrait bactérien aux concentrations indiquées, sont incubés 10 minutes à 37°C. Un échantillon de 250 µl est alors prélevé et rapidement jeté dans 1,6 ml d'acide acétique 0,2 M préalablement déposé à la surface d'une petite colonne (0,7 cm x 7 cm) de Dowex AG 50 (X 8) "200 à 400 mesh" sous forme H^+. L'effluent est directement recueilli dans une fiole de comptage en verre. Après 3 rinçages de la colonne par 1 ml d'eau, l'effluent total est évaporé à 60°C.

Le résidu est redissous dans 0,5 ml d'eau, puis 10 ml de mélange scintillant de BRAY / 37 / sont ajoutés. La radioactivité est mesurée dans un compteur Nuclear Chicago, mark II.

La quantité d'extrait bactérien et le temps d'incubation ont été choisis pour rester dans les conditions de mesure de la vitesse initiale / 36 /.

6.2 - Unité Enzymatique et Activité Spécifique

Une unité d'ATCase est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la formation d'une µ mole de carbamyl aspartate par heure dans les conditions standards. L'activité spécifique des enzymes, purifiés ou en extraits bactériens est exprimée en unités par mg de protéines. La concentration en protéines des extraits et des solutions d'enzymes purifiés a été déterminée selon la méthode de LOWRY, ROSEBROUGH, FARR et RANDALL / 38 /, utilisant la sérum albumine bovine comme standard. Cette méthode, toujours utilisée, sauf cas particuliers, pour la détermination des activités spécifiques des enzymes en extraits cellulaires ou purifiés, surestime la concentration de 20 % par rapport aux concentrations en ATCases et en sous-unités normales et 2-ThioU-modifiées mesurées par l'absorption à 280 nm.

6.3 - Rapport des Activités à pH 7 et pH 8,4

Pour la détermination de ce rapport les activités ont été mesurées dans les conditions standards mais en présence d'aspartate 5 mM, et de carbamyl phosphate 5 mM, dans un tampon cacodylate de sodium 50 mM, pH 7, ou Tris-acétate 50 mM, pH 8,4.

6.4 - Mesure du Taux d'Inhibition par le CTP

La rétroinhibition par le CTP a été mesurée dans les conditions standards mais en présence d'aspartate 5 mM, de carbamyl phosphate 5 mM, dans le tampon cacodylate de Sodium 50 mM, pH 7, avec et sans CTP aux concentrations indiquées.

6.5 - Mesure de la Stimulation de l'Activité par l'ATP

La stimulation de l'ATCase ou de la 2-ThioU-ATCase a été mesurée dans les conditions standards mais en présence d'aspartate 5 mM, de carbamyl phosphate 5 mM, dans le tampon cacodylate de sodium, 50 mM, pH 7, avec et sans ATP aux concentrations indiquées.

6.6 - Mesure de l'Activité en Présence de PALA

L'activité enzymatique en présence de N-(phosphonacétyl)-L-Aspartate (PALA) a été déterminée dans les conditions standards en présence d'aspartate 1 mM, dans le tampon cacodylate de sodium 50 mM, pH 7, et en présence de carbamyl phosphate et de PALA aux concentrations indiquées.

6.7 - Traitement des Résultats

Dans les cas où les cinétiques enzymatiques effectuées obéissaient à la loi classique de MICHAËLIS-MENTEN / 39 /, les valeurs de V_m et de K_m estimées d'après les représentations de Lineweaver-Burk ont été soumises à l'analyse statistique. Ce traitement des résultats par une méthode itérative d'après CLELAND / 40 / a été effectué par une calculatrice électronique "Wang" (modèle 370), couplée avec un télétype. La calculatrice du Laboratoire d'Enzymologie Physico-Chimique et Moléculaire de la Faculté des Sciences d'Orsay a été ainsi utilisée, grâce à la collaboration du Docteur R. ALAZARD.

7 - ELECTROPHORESES SUR GELS DE POLYACRYLAMIDE

7.1 - Electrophorèses en Conditions non Dénaturantes

Les électrophorèses de l'ATCase et 2-ThioU-ATCase, ainsi que de leurs sous-unités ont été réalisées sur gels de polyacrylamide préparés et utilisés selon la

technique proposée par CANALCO. Pour les électrophorèses "standards", les gels contenaient 7,5 % d'acrylamide et 0,2 % de bisacrylamide. Les charges et poids moléculaires des enzymes normal et 2-ThioU-modifié ont été comparés selon HEDRICK et SMITH / 41 / par électrophorèse sur gels qui contenaient des quantités croissantes d'acrylamide et de bis-acrylamide, depuis 4,7 % d'acrylamide et 0,12 % de bis-acrylamide jusqu'à 8 % d'acrylamide et 0,21 % de bis-acrylamide. La migration électrophorétique a été réalisée dans un tampon Tris-glycine 50 mM, pH 8,3. Le bleu de bromophénol a été utilisé comme indicateur de front de migration.

Les protéines ont été révélées par incubation des gels pendant 2 heures dans du bleu de Coomassie 0,05 % en solution dans le mélange méthanol / acide acétique / eau (5 : 1 : 5) ou dans une solution d'Amido Schwarz à 1 % dans l'acide acétique 7,5 %. La décoloration des gels a été réalisée dans une solution de méthanol 20 %, et d'acide acétique 7,5 %, contenant une résine Dowex AG - 1 X 8 (200 à 400 mesh).

7.2 - Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide Contenant du Dodécylsulfate de Sodium

Le contenu en chaînes polypeptidiques des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée a été étudié par électrophorèse sur gel en plaque contenant 12,5 % d'acrylamide, 0,33 % de bis-acrylamide et 0,1 % de dodécylsulfate de sodium (SDS), selon LAEMMLI / 42 /. Les protéines ont été préincubées 5 minutes à 100°C dans un tampon Tris-HCl 0,063 M, pH 6,8, contenant 3 % de SDS, 5 % de β-mercaptoéthanol et 10 % de glycérol. Le tampon d'électrophorèse décrit précédemment a été utilisé et contenait dans ce cas 0,1 % de SDS. Les protéines ont été colorées dans la solution de bleu de Coomassie précédemment décrite.

8 - ANALYSES PAR CENTRIFUGATIONS

8.1 - Centrifugations Zonales en Gradient de Saccharose

Les centrifugations zonales en gradients linéaires de saccharose (5 à 20 % dans un tampon Phosphate de Potassium 1 mM, pH 7) ont été réalisées pendant 11 heure à 36 000 rev/min. Un rotor SW 39 a été utilisé.

8.2 - Détermination des Coefficients de Sédimentation

Les coefficients de sédimentation ont été déterminés par l'étude des vitesses de sédimentation au cours d'une centrifugation à 60 000 rev/min, à 20°C, dans une ultra-centrifugeuse Spinco, modèle E, équipée avec les systèmes d'optique Schliere et de Rayleigh. Les centrifugations ont été réalisées par Monsieur G. BATELIER, au Laboratoire d'Enzymologie du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette.

9 - SPECTROSCOPIE DE DICHROÏSME CIRCULAIRE

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été effectués à l'aide d'un dichrographe Jouan, modèle II.

9.1 - Spectres de Dichroïsme Circulaire des protéines

Les solutions d'ATCases et de sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU modifiées aux concentrations de 1 à 2,5 mg par ml ont été préparées dans un tampon Imidazole-acétate 0,04 M, pH 7,0, contenant du β-mercaptoéthanol 2 mM et de l'EDTA de sodium 0,2 mM. Les sous-unités régulatrices normales et 2-ThioU-modifiées aux concentrations de 1 à 1,5 mg par ml étaient en solution dans un tampon phosphate de potassium 0,04 M, pH 7,0, contenant du β-mercaptoéthanol 2 mM et de l'acétat de zinc 0,2 mM. Chaque solution a été filtrée sur filtres Millipore (0,45μ) et intro-

duite dans une cuve en quartz ayant un trajet optique de 1 cm (Hellma cells, Inc. Jamaïca, New York).

Les spectres de dichroïsme circulaire de ces solutions ont été enregistrés contre ceux des tampons filtrés introduits dans la cuve de référence.

9.2 - Spectres de Différence dus à la Liaison du CTP

Les spectres de différence dus à la liaison du CTP, qui est optiquement actif entre 250 et 310 nm ont été déterminés en utilisant une cuve en quartz à deux compartiments (Hellma Cells, Inc., Jamaïca, New York) / 43 , 44 /. Le trajet optique de chaque compartiment est de 0,44 cm. 0,8 ml de solution de protéines et 0,8 ml de solution de CTP ont été respectivement introduits dans l'un et l'autre des compartiments. Les spectres de différence ont été calculés à partir des spectres enregistrés avant et après le mélange des solutions contenues dans les deux compartiments.

9.3 - Spectres de Différence dus à la Liaison des Substrats

Les spectres de différence dus à la liaison du carbamyl phosphate et du succinate ont été calculés à partir des spectres des protéines enregistrés en absence et en présence des ligands. La cuve en quartz à deux compartiments, décrite pour la liaison du CTP, a été utilisée, et les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés avant et après le mélange des solutions de protéines et de ligands respectivement contenues dans chacun des compartiments. Les différences entre les ellipticités observées ont été calculées, puis converties en différences d'ellipticités molaires, $\Delta [\theta]$.

10 - SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION

Les spectres d'absorption en ultra-violet ont été effectués à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 15 à 20°C.

10.1 - Spectres d'Absorption des Protéines

Les solutions d'ATCase et de sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU modifiées aux concentrations de 0,5 à 3 mg par ml ont été dialysées 24 heures à 4°C contre un tampon Phosphate de Potassium 0,04 M, pH 7,0, contenant du β-mercapto éthanol 2 mM et de l'EDTA de sodium 0,2 mM. Les solutions de sous-unités régulatrices à 4 mg/ml ont été dialysées contre le même tampon contenant de l'acétate de zinc 0,2 mM au lieu de l'EDTA de sodium. Chaque solution dialysée a été filtrée sur filtres Millipore (0,45 μ) et introduite dans une cuve en quartz ayant un trajet optique de 1 cm (Hellma Cells, Inc. Jamaïca, New York).

Les spectres d'absorption de ces solutions ont été enregistrés contre ceux des tampons filtrés introduits dans la cuve de référence.

10.2 - Détermination des Coefficients d'Extinction

Dans le but de déterminer les coefficients d'extinction des protéines, des aliquotes de 200 μl à 500 μl d'échantillons contenant 0,25 mg à 0,5 mg de protéines ont été prélevés de la cuve aussitôt après l'enregistrement du spectre d'absorption et hydrolysés 24 heures ou 72 heures à 110°C par 2 ml d'HCl 5,7 N bi-distillé en présence de 125 nmoles de norleucine comme standard de référence interne. Trois analyses du contenu en amino-acides de chaque échantillon ont été réalisées sur un analyseur, Beckman, modèle 120 C / 45 / dans le Laboratoire du Docteur Florence LEDERER, Institut de Génétique Moléculaire, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette.

10.3 - Spectres de Différence d'Absorption dus à la Liaison du PALA

Les spectres de différence d'absorption dus à la liaison du PALA ont été directement enregistrés à l'aide du spectrophotomètre Cary 15 à 20°C. Les protéines en solution ont été dialysées contre un tampon phosphate de potassium 0,04 M, pH 7,0, contenant du β-mercaptoéthanol 2 mM et de l'EDTA de sodium 0,2 mM, puis filtrées sur filtre Millipore (0,45 μ). La concentration en protéines de chaque solution

a été déterminée spectrophotométriquement. Un ml de solution d'un enzyme a été introduit dans chacune des deux cuves de 1 cm de chemin optique. Une cuve était la référence et l'autre la cuve de mesure. Les deux cuves ont été placées dans leurs compartiments respectifs, et la ligne de base a été enregistrée sur l'échelle de sensibilité de 0,1.

Pour les titrages des sites catalytiques par le PALA, un aliquote de PALA (1 µl à 3 µl) a été ajouté dans la cuve de mesure, tandis qu'un même volume d'eau filtrée était introduit dans la cuve de référence à l'aide de seringues Hamilton de 10 µl. Après le mélange, le spectre de différence d'absorption a été enregistré. Cette opération a été répétée jusqu'à saturation complète des sites de liaison du PALA.

11 - DIALYSES A L'EQUILIBRE EN PRESENCE DE CTP

11.1 - Purification du CTP

Au cours de l'étude par dialyses à l'équilibre des affinités du CTP pour les ATCases normale et 2-ThioU-modifiée, il était impératif d'utiliser des nucléosides triphosphates exempts de produits de dégradation ou d'autres nucléosides. Dans le but de repurifier le CTP, 100 mg de CTP commercial ont été dissous dans 10 ml de Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6 et déposés sur une colonne de Dowex AG 1 X 8 (Cl^-) (2 x 5 cm). L'élution a été réalisée par un litre d'un gradient linéaire de 0 à 0,2 M en LiCl dans HCl 0,01 M, à un débit de 90 ml à l'heure. L'élution des nucléosides a été suivie par l'absorption à 260 mµ . Les fractions contenant le CTP purifié (élué à 0,12 M LiCl) ont été réunies (260 ml) et neutralisées avec LiOH 2 N, puis évaporées jusqu'à obtention d'un sirop de 6 ml environ. Après dilution au-demi par du méthanol, ce résidu a été traité par l'acétone à - 20°C pour précipiter les nucléosides. Les nucléosides ont été recueillis par centrifugation et à nouveau lavés par le méthanol et l'acétone puis par l'éther et séchés selon la méthode de SMITH et KHORANA / 46 /.

11.2 - Dialyses à l'équilibre

Les dialyses à l'équilibre pour l'étude des affinités du CTP pour les ATCases normale et 2-ThioU-modifiée ont été effectuées dans des cellules de polyméthylacrylate selon la méthode de MYER et SCHELLMAN / 47 /. Les deux compartiments de volume égal à 100 µl ont été séparés par une membrane Visking tubing 20/32 prétraitée par lavages successifs dans l'EDTA 0,1 M bouillant, $NaHCO_3$ 5 % et l'éthanol 50 %, puis équilibrée dans le tampon de dialyse. 80 µl de solution de protéines dans le tampon imidazole-acétate 0,05 mM, pH 7,0, β-mercaptoéthanol 2 mM et EDTA 0,2 mM, ont été introduits à l'aide d'une seringue Hamilton dans l'un des compartiments ("compartiment protéine") de chaque cellule. 80 µl d'une solution de ^{3}H-CTP dans le même tampon ont été introduits dans le compartiment opposé ("compartiment ligand"). Les solutions de ^{3}H-CTP ont été préparées à partir de ^{3}H-CTP commercial (22 Ci/mmole, 0,5 mCi/ml) dont la pureté (98 %) a été recontrôlée, et de CTP froid purifié selon la méthode décrite ci-dessus. Des solutions de ^{3}H-CTP aux concentrations variant de 5×10^{-6} M à 2×10^{-4} M, et de radioactivité finale de 2 300 cpm/ µl ont été préparées à partir de 1 ml de solution de CTP froid et de 5 µl de la solution commerciale de ^{3}H-CTP. La concentration en CTP de chaque solution a été contrôlée par absorption en ultra-violet (ε_M = $9,1 \times 10^3$ à 271 nm). Les concentrations en protéines, déterminées selon LOWRY et coll. / 38 /, et les concentrations initiales en CTP ont été choisies pour obtenir à l'équilibre un pourcentage de liaison du CTP initial de 80 à 30 %. Dans les conditions d'agitations utilisées, à 4°C, le temps d'équilibre était de 44 à 50 heures. L'activité spécifique des enzymes ne varie pas dans ces conditions.

Une fois l'équilibre atteint, des aliquotes de 10 µl de solutions ont été prélevés dans chaque compartiment d'une cellule et leurs radioactivités déterminées par spectrométrie à scintillation liquide (Nuclear Chicago) après mélange à une solution scintillante de Bray.

D_p et D_l étant les radioactivités respectives des compartiments "protéine" et "ligand", les concentrations en CTP lié et libre ont été déterminés selon les relations suivantes :

$$\left[\text{CTP lié}\right] = \frac{\left[\text{CTP}_{\text{initial}}\right] \quad (D_p - D_l)}{D_p + D_l}$$

$$\left[\text{CTP libre}\right] = \frac{\left[\text{CTP}_{\text{initial}}\right] \quad (D_l)}{D_p + D_l}$$

La radioactivité totale adsorbée par les membranes n'excèdait pas 12 %. Il a été vérifié que les concentrations en protéines n'avaient pas varié sensiblement au cours de la formation de l'équilibre. Pour chaque équilibre, la valeur de $\overline{\nu}$, concentration en ligand lié par mole d'enzyme, a été calculée, et les valeurs de

$$\frac{\overline{\nu}}{\left[\text{CTP}_{\text{libre}}\right]}$$

ont été représentées en fonction de $\overline{\nu}$ selon SCATCHARD / 48 /. Selon cette représentation graphique, lorsqu'il existe pour la fixation d'un ligand une seule classe de sites équivalents et indépendants, une droite est obtenue. L'équation de cette droite est :

$$\frac{\overline{\nu}}{\left[\text{ligand}_{\text{libre}}\right]} = k\,(n - \overline{\nu})$$

où k est la constante d'association du ligand au site de liaison, et n est le nombre maximum de sites de liaison par mole de protéine. Les intersections de la droite avec l'axe des ordonnées et celui des abscisses sont respectivement égales à $n\,k$ et à n.

L'estimation des paramètres par une méthode de régression multi-linéaire itérative a été réalisée par une calculatrice Wang, modèle 720 C, à Gif-sur-Yvette selon un programme établi par le Docteur Philippe DESSEN.

12 - ANALYSES DU CONTENU EN ACIDES AMINES

12.1 - Conditions Standards

Les protéines ont été hydrolysées, dans des tubes en Pyrex scellés sous vide, par l'HCl 6 N à 110°C pendant 24 heures ou 72 heures. Les analyses du contenu en acides aminés ont été réalisées à l'aide d'un analyseur Beckmann, modèle 120 C, dans le Laboratoire du Docteur F. LEDERER, ou d'un auto-analyseur manuel Technicon, modèle 3 A-1, dans le Service de Biochimie du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay.

12.2 - Détermination du Contenu en Tryptophane

12.2.1 - Hydrolyses des protéines dans les conditions protectrices du tryptophane

5 mg de protéines ont été hydrolysés pendant 24 heures à 105°C dans l'HCl 6 N contenant de l'acide thioglycolique 2,5 % selon MATSUBARA et SASAKI / 49 / ou dans l'acide p-toluène-sulfonique 3,4 N contenant du 3-(2-amino éthyl)-indole 0,2 % selon LIU et CHANG / 50 /. Les échantillons hydrolysés ont été analysés sur l'auto-analyseur manuel Technicon, modèle 3 A-1, l'élution de la colonne était réalisée par un tampon citrate de sodium, pH 5,3.

12.2.2 - Méthodes spectroscopiques

Deux méthodes spectroscopiques ont été utilisées. Selon SPANDE et WITKOP / 51 /, les spectres d'absorption de solutions d'enzymes à la concentration de 1 mg par ml dans un tampon acétate 0,094 M, pH 4,7 et urée 9 M ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 15 en présence de concentrations croissantes de N-bromo succinimide. L'absorption à 280 nm décroît proportionnellement à l'oxydation du tryptophane, ce qui permet le titrage de cet acide aminé.

La seconde méthode consiste à déterminer le contenu en tyrosines et en tryptophanes par mesure de l'absorption en ultra-violet des protéines dénaturées dans la soude 0,1 N selon BENCZE et SCHMID / 52 /.

12.3 - Détermination du Contenu en Acide Cystéique après Oxydation Performique

L'oxydation performique, qui transforme les cystéines et les cystines si elles existent, contenues dans les protéines en résidus d'acide cystéique a été réalisée selon la méthode de MOORE / 53 /. L'acide performique a été préparé "ex temporane", en mélangeant de l'eau oxygénée à de l'acide formique dans le rapport 1/9. Le mélange est refroidi à 0°C après être resté 1 heure à la température ambiante.

Les échantillons, contenant 2 mg de protéines lyophylisées ont été incubés dans 2 ml d'acide performique pendant 4 heures à 0°C, puis 0,3 ml d'HBr 48 % ont été ajoutés. Après lyophylisation les échantillons ont été hydrolysés par 3 ml d'HCl 6 N sous vide à 110°C pendant 18 heures. Après évaporation de l'HCl, les résidus ont été redissous dans 2,2 ml de tampon, pH 2,75, puis analysés à l'aide de l'analyseur Technicon, modèle 3 A-1, en utilisant un gradient de pH allant de 2,75 à 6,10.

13 - DETERMINATIONS DU CONTENU EN ZINC

Le contenu en zinc des enzymes a été déterminé à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique Perkin Elmer, modèle 290 B. Les échantillons ont été préalablement dialysés extensivement trois fois contre un tampon Tris-acétate 0,01 M, pH 7, ou imidazole-acétate 0,04 M, pH 7 , ou bien, après dialyse contre de l'EDTA de sodium 1 mM, les échantillons ont été passés sur colonne de Séphadex G-25 pour éliminer l'EDTA. L'élution était en ce cas réalisée par un tampon Tris-acétate 0,01 M, pH 7,5. Les solutions étalons de zinc ont été préparées à partir d'acétate de zinc (Merck) à 50 µg de zinc par ml dans le tampon tris-acétate 0,01 M, pH 7,5.

CHAPITRE III

RESULTATS

1 - LA 2-THIOURACILE-ASPARTATE TRANSCARBAMYLASE, NORMALEMENT CONSTITUEE DE CHAINES REGULATRICES ET CATALYTIQUES, SE COMPORTE VIS-A-VIS DE CERTAINES PROPRIETES COMME DES SOUS-UNITES CATALYTIQUES ISOLEES

La dissociation de l'ATCase, en ses sous-unités régulatrices et catalytiques, provoque dans l'environnement des sites catalytiques des perturbations telles que les propriétés liées à l'activité enzymatique sont altérées de manière très sensible et très précise. En effet, les contraintes dues à l'existence des interactions entre sous-unités sur la structure des sites catalytiques disparaissent, ce qui se manifeste au niveau des sous-unités isolées :

- par la perte des interactions homotropes entre sites catalytiques pour la liaison du substrat aspartate, d'une part ;
- par une altération des propriétés liées à la catalyse, d'autre part.

La thermosensibilité des sites actifs est en outre accrue / 24 /.

Bien que l'ATCase synthétisée en présence de 2-thiouracile (2-ThioU-ATCase) soit, comme le démontrent les analyses exposées en première partie du présent chapitre, un enzyme natif, contenant les sous-unités catalytiques et régulatrices en proportion normale, il se comporte vis-à-vis des propriétés particulières décrites précédemment, comme les sous-unités catalytiques isolées.

1.1 - Les Molécules d'Aspartate Transcarbamylase Synthétisées en Présence de 2-Thiouracile sont des Enzymes Natifs Modifiés et non des Sous-Unités Catalytiques Libres

Afin de déterminer le contenu en sous-unités de la 2-ThioU-ATCase, l'analyse de l'enzyme comparativement à celles de l'ATCase et des sous-unités catalytiques isolées a été réalisée dans l'extrait cellulaire par centrifugation zonale. Sous forme purifiée, les ATCases normale et 2-ThioU-modifiée ont été étudiées par électrophorèse en condition normale ou dissociante, par ultra-centrifugation, et par équilibre de sédimentation. Il a été vérifié que la complète purification de ces protéines ne modifie pas leurs propriétés.

1.1.1 - Centrifugation de zone en gradient de saccharose

Des échantillons respectivement : de 50 μl (20 μg de protéines) d'extraits bruts de bactéries déréprimées en présence de 2-thiouracile à une concentration de 500 μg par ml ; de 250 μg d'ATCase normale purifiée ; et de 300 μg de sous-unités catalytiques libres ont été comparativement analysés par centrifugation en gradient de 5 à 20 % de saccharose, selon la technique décrite dans "Méthodes". Des fractions de 200 μl ont été collectées et leur activité ATCase a été testée. Les résultats, présentés figure 2, montrent que la 2-ThioU-ATCase migre dans ces conditions comme l'ATCase native et très différemment des sous-unités catalytiques.

1.1.2 - Electrophorèse sur gels de polyacrylamide

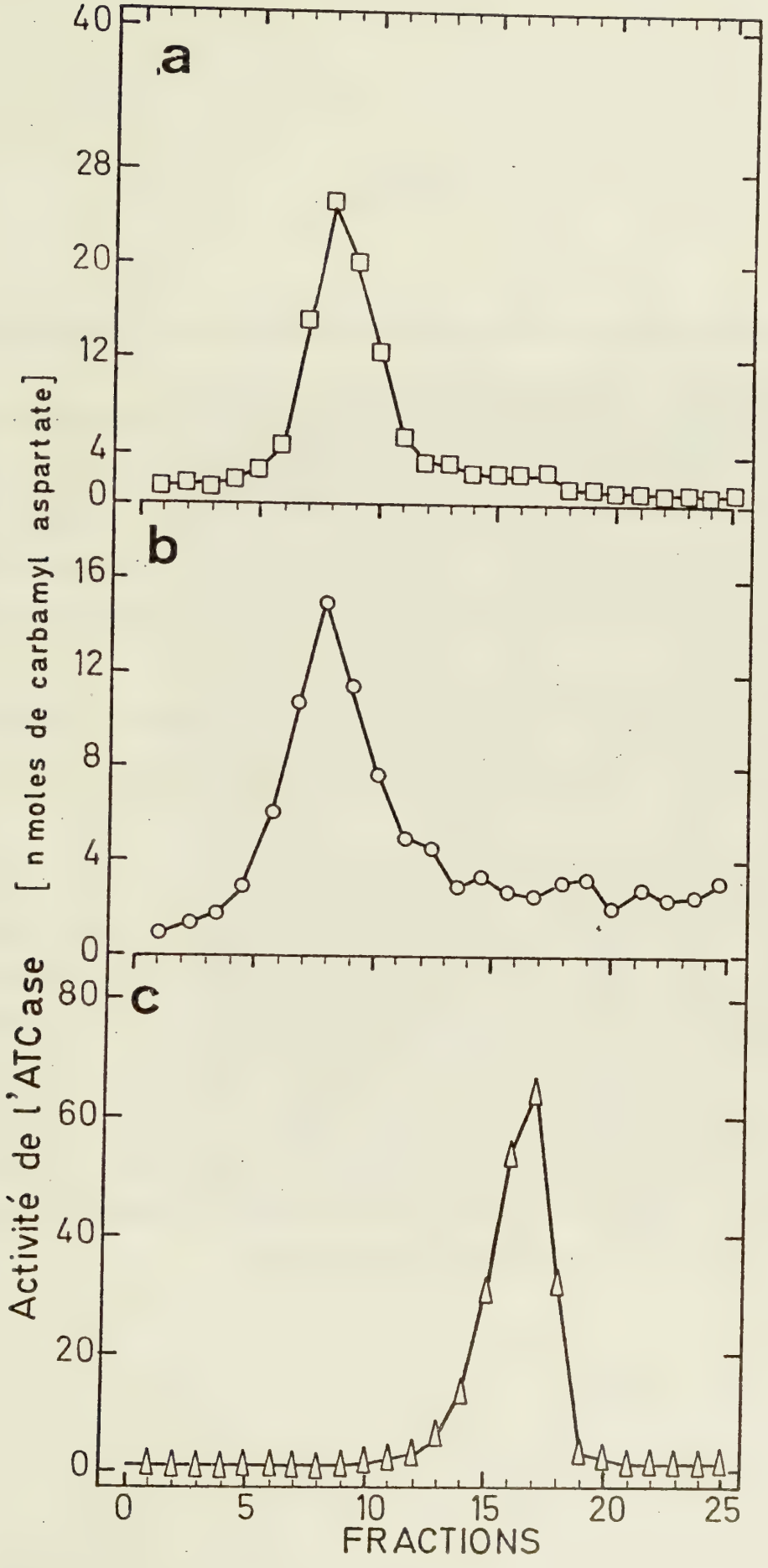
Dans le but de comparer la migration en électrophorèse sur gels de polyacrylamide de la 2-ThioU-ATCase aux migrations respectives de l'ATCase normale et des sous-unités catalytiques, la 2-ThioU-ATCase synthétisée en présence de 500 μg par ml de 2-thiouracile a été purifiée selon la technique décrite dans "Méthodes". Le Cliché 1 permet de constater que, dans les conditions standards d'électrophorèse décrites

FIGURE 2

Analyse de la 2-ThioU-ATCase par centrifugation zonale en gradient de saccharose.

Un échantillon de 50 μl (20 μg de protéines) d'extrait de bactéries déréprimées en présence de 500 μg/ml de 2-thiouracile a été analysé, comparativement à l'ATCase normale purifiée (250 ng) et aux sous-unités catalytiques (300 ng), par centrifugation pendant 11 heures à 36 000 rev/min dans un gradient linéaire de saccharose (5 à 20 %, dans le tampon phosphate de potassium 10^{-3} M, pH 7) à 4°C. Un rotor SW 39 a été utilisé. Des fractions de 200 μl ont été recueillies, dont 100 μl ont été utilisés pour la mesure de l'activité aspartate transcarbamylase dans les conditions standards.

(a) 2-ThioU-ATCase ; (b) ATCase normale native ; (c) Sous-unités catalytiques.


a
b
c
40
28
20
12
4
0
16
12
8
4
0
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
FRACTIONS
Activité de l'ATCase [n moles de carbamyl aspartate]

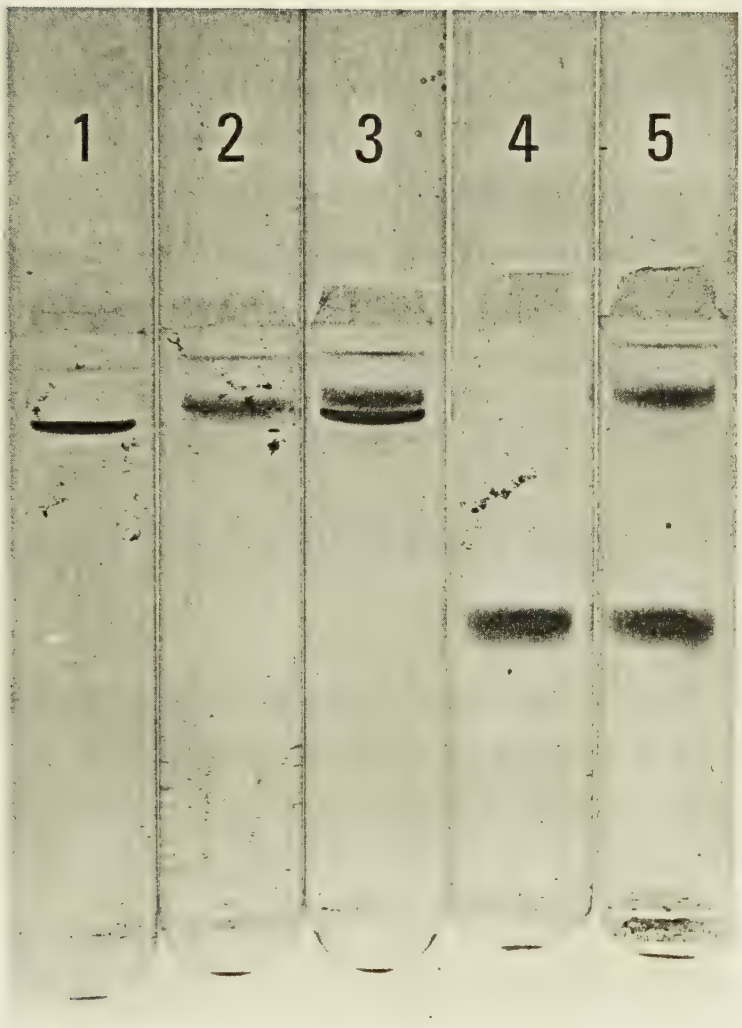
CLICHE 1

Analyse de la 2-ThioU-ATCase par électrophorèse sur gels de polyacrylamide.

Des échantillons de 10 µ g de 2-ThioU-ATCase purifiée ont été analysés comparativement à l'ATCase normale purifiée (10 µ g) et aux sous-unités catalytiques libres (16 µg) par électrophorèse sur gels contenant 7,5 % de polyacrylamide et 0,2 % de bis-acrylamide dans un tampon Tris-glycine (pH 8,3), selon la technique décrite dans "Méthodes". Les protéines ont été révélées par l'Amido Schwarz à 1 % dans l'acide acétique 7,5 %.

1 - ATCase normale ; 2 - 2-ThioU-ATCase ; 3 - Mélange d'ATCase normale et de 2-ThioU-ATCase ; 4 - Sous-unités catalytiques ; 5 - Mélange de 2-ThioU-ATCase et de sous-unités catalytiques.

Les préparations purifiées d'ATCases normale et modifiée contiennent 2 à 5 % de dimère qui peut être éliminé par centrifugation dans un gradient de saccharose selon GERHART et HOLOUBEK / 34 /, ou par chromatographie d'une solution contenant 400 mg de protéines dans 15 ml de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contenant du β-mercapto éthanol 2 mM et du KCl 0,22 M, sur une colonne (Ø 3 cm x 40 cm) de D E A E - Séphadex A-50. L'élution de la colonne est, dans ce cas, réalisée par un gradient de KCl de 0,22 M à 0,48 M dans le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contenant du β-mercapto éthanol 2 mM. L'enzyme purifié est ensuite concentré et conservé dans les conditions décrites dans "Méthodes".


1
2
3
4
5

dans "Méthodes", la 2-ThioU-ATCase ne migre absolument pas comme les sous-unités catalytiques libres, mais de façon analogue à l'ATCase normale. La légère différence observée dans les valeurs des R_m de l'ATCase normale et de la 2-ThioU-ATCase indique une faible différence dans leurs charges ou conformations.

1.1.3 - Electrophorèses sur gels contenant des proportions croissantes en acrylamide

La variation de la mobilité des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée en fonction de la concentration en acrylamide selon HEDRICK et SMITH / 41 / a été étudiée dans les conditions décrites dans "Méthodes". Comme le montre la figure 3, lorsque le logarithme de la mobilité relativement au front de migration (R_m) est exprimé en fonction de la concentration en acrylamide, une droite est obtenue. Les droites correspondant aux ATCases normale et 2-ThioU-modifiée sont parallèles indiquant entre ces enzymes une différence de charge mais non de poids moléculaires. L'intersection des deux droites aurait signifié une différence dans leurs poids moléculaires / 41 /.

1.1.4 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium

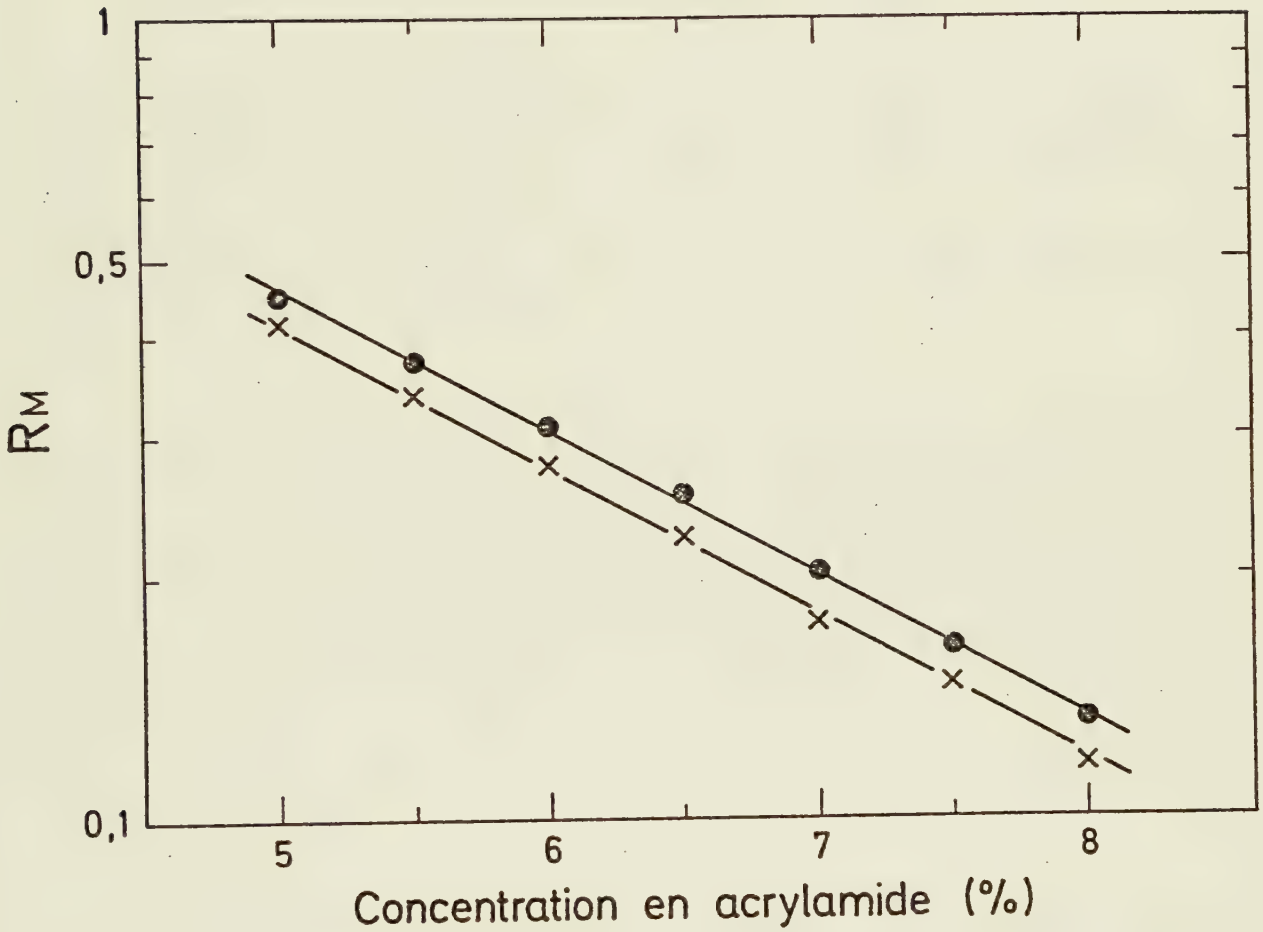
En électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant 0,1 % de dodécylsulfate de sodium (SDS), condition dans laquelle l'ATCase normale est dissociée en chaînes catalytiques et régulatrices, la migration de ces chaînes est fonction de leurs poids moléculaires (33 000 pour les chaînes catalytiques et 17 000 pour les chaînes régulatrices / 4 /). Selon les conditions décrites dans "Méthodes", la 2-ThioU-ATCase et l'ATCase normale ont été incubées dans une solution contenant 3 % de SDS et 5 % de β-mercaptoéthanol, puis analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en plaque contenant 0,1 % de SDS.

Par incubation du gel dans le bleu de Coomassie, les bandes protéiques ont été spécifiquement colorées, et la proportion relative des chaînes catalytiques et régulatrices dans chaque enzyme a été déterminée par mesure de l'intensité d'absorption de chacune de ces bandes.

FIGURE 3

Mobilité électrophorétique des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée en fonction de la concentration en acrylamide.

4,5 µg de 2-ThioU-ATCase (x) et d'ATCase (●) ont été analysés par électrophorèses sur gels de polyacrylamide contenant des quantités croissantes d'acrylamide et de bis-acrylamide, selon HEDRICK et SMITH / 41 /, dans les conditions décrites dans "Méthodes".


1
0,5
0,1
RM
5
6
7
8
Concentration en acrylamide (%)

Comme le montre le Cliché 2, la 2-ThioU-ATCase est dissociable en deux espèces de chaînes, et aucune différence n'a été détectée entre l'ATCase normale et la 2-ThioU-ATCase en ce qui concerne les poids moléculaires et la proportion des deux espèces de chaînes.

1.1.5 - Dissociation de la 2-ThioU-ATCase en deux espèces de sous-unités

Les résultats précédents ont donc permis de constater que l'activité ATCase qui apparaît lorsque le mutant auxotrophe pour l'uracile est déréprimé en présence de 2-thiouracile n'est pas due à la synthèse de sous-unités catalytiques libres, mais d'une ATCase native modifiée, contenant en proportion normale les deux espèces distinctes de chaînes polypeptidiques.

GERHART et SCHACHMAN / 3 / ont démontré qu'en présence de réactifs de groupements sulfhydriles, tels que le parahydroxymercuribenzoate (PHMB), l'ATCase normale se dissocie en deux types de sous-unités aisément séparables par centrifugation de zone ou chromatographie sur DEAE-Séphadex. Chaque molécule d'enzyme se dissocie en deux sous-unités catalytiques, qui sont des trimères de chaînes catalytiques / 6 , 7 , 8 / et trois sous-unités régulatrices, qui sont des dimères de chaînes régulatrices / 10 /. Ces formes moléculaires sont constitutives de la molécule native / 14 , 16 , 18 /.

Après avoir constaté que la 2-ThioU-ATCase était dissociable par le PHMB en sous-unités, que nous appellerons "2-ThioU-catalytiques"et "2-ThioU-régulatrices", la préparation et la séparation des sous-unités ont été réalisés selon la méthode de GERHART et HOLOUBEK / 34 /, dans les conditions décrites dans "Méthodes".

1.1.5.1 - Analyse des sous-unités de la 2-ThioU-ATCase par ultracentrifugation analytique et par sédimentation à l'équilibre

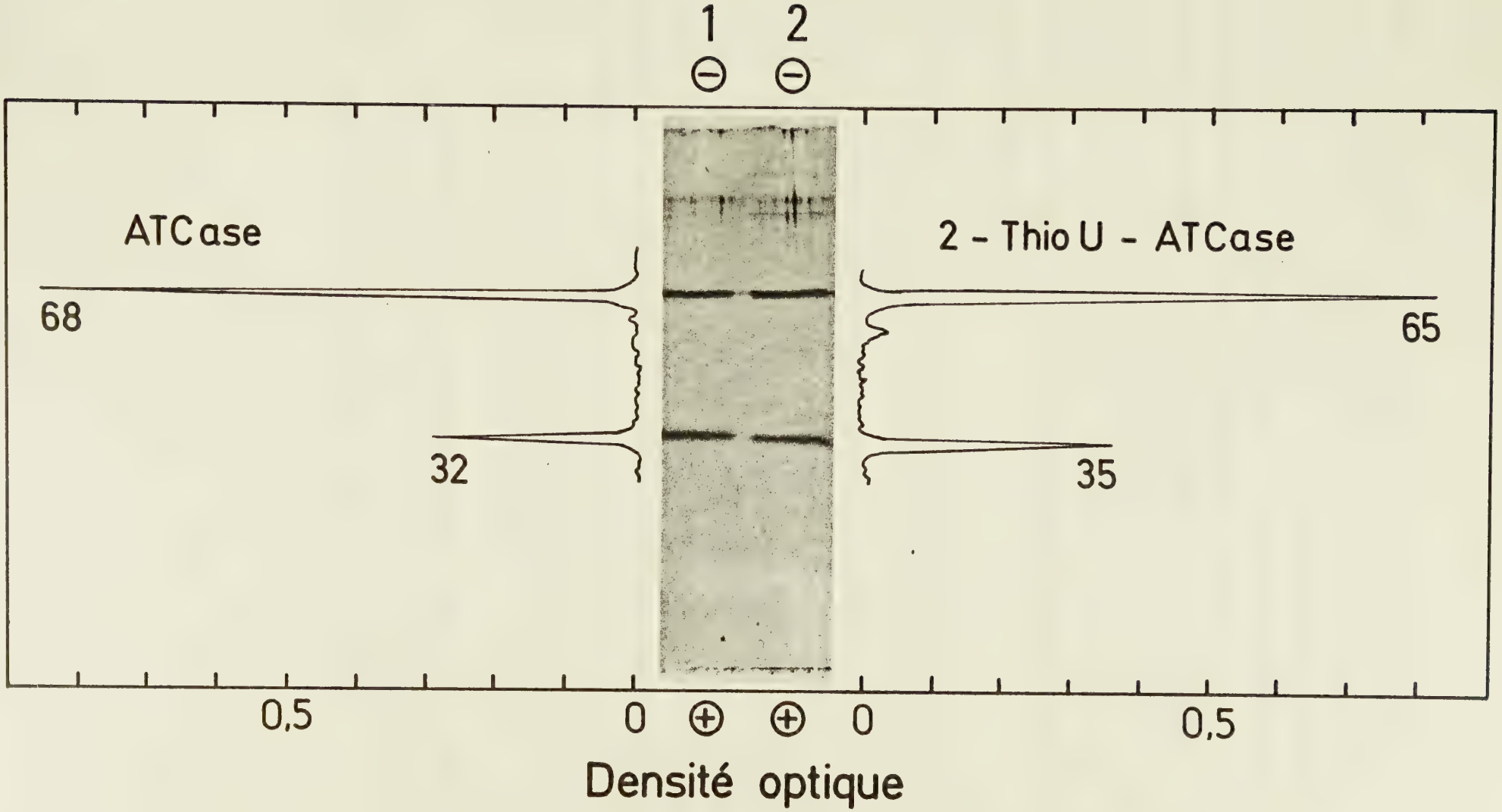
La 2-ThioU-ATCase possède un contenu normal en chaînes catalytiques et régulatrices (paragraphe 1.1.4). Dans le but de déterminer le nombre de chaînes

CLICHE 2

Analyse des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant 0,1 % de dodécylsulfate de sodium.

Un µg de chaque espèce d'enzymes a été préincubé dans un tampon Tris-HCl 0,063 M, pH 6,8, contenant 3 % de dodécylsulfate de sodium (SDS), 5 % de β-mercapto-éthanol, 0,001 % de bleu de bromophénol et 10 % de glycérol (volume total 50 µl), durant 5 minutes à 100°C. L'électrophorèse a été réalisée pendant 4 heures sous une intensité de 20 mA, sur un gel de polyacrylamide en plaque de composition décrite dans "Méthodes", contenant 0,1 % de SDS. Les protéines ont été colorées par le bleu de Coomassie et l'intensité des bandes colorées a été mesurée par un photomètre intégrateur Vernon.

1). ATCase ; 2). 2-ThioU-ATCase. Le nombre indiqué auprès de chaque pic correspond à sa surface relative.


1
2
⊖
⊖
ATCase
68
32
2 - Thio U - ATCase
65
35
0,5
0
⊕
⊕
0
0,5
Densité optique

polypeptidiques par sous-unité, les poids moléculaires des sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU-modifiées ont été déterminés par équilibre de sédimentation, et comparés. En outre, les coefficients de sédimentation de ces espèces enzymatiques ont été mesurés par ultra-centrifugation analytique. Les valeurs des coefficients de sédimentation et des poids moléculaires, indiqués dans les Tableaux I et II ne montrent aucune différence significative entre les ATCases normale et 2-ThioU-modifiée ni entre leurs sous-unités catalytiques. Par analogie avec la constitution de l'ATCase et des sous-unités catalytiques normales, ce résultat indique que les chaînes "2-ThioU-catalytiques" sont organisées en trimères, et que ces trimères sont au nombre de deux par molécule de 2-ThioU-ATCase.

1.1.5.2 - Analyse des sous-unités de la 2-ThioU-ATCase par electrophorèse

Les sous-unités 2-ThioU-catalytiques et 2-ThioU-régulatrices ont été analysées par électrophorèse sur gels de polyacrylamide, comparativement aux sous-unités normales. Comme le montre le Cliché 3, les sous-unités 2-ThioU-catalytiques migrent un peu plus lentement que les sous-unités catalytiques au cours d'une électrophorèse dans les conditions standards. Puisqu'il a été vérifié qu'il n'y a pas de différence détectable entre les mobilités électrophorétiques des sous-unités régulatrices normales et 2-ThioU-modifiées, dans les mêmes conditions, il apparaît ainsi que c'est une modification des sous-unités catalytiques qui est responsable de la différence des mobilités entre l'ATCase et la 2-ThioU-ATCase (paragraphe 1.1.2 et 1.1.3).

Les sous-unités 2-ThioU-catalytiques possèdent donc une charge et probablement une conformation différente de la normale, ce qui leur confère, ainsi qu'à la 2-ThioU-ATCase, des propriétés électrophorétiques légèrement affectées.

TABLEAU I

Coefficients de sédimentation des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités catalytiques

Les solutions d'ATCase (4 mg/ml), de sous-unités catalytiques (4 mg/ml), de 2-ThioU-ATCase (2,9 mg/ml) et de sous-unités 2-ThioU-catalytiques (2,5 mg/ml) dans un tampon phosphate de potassium 0,04 M, pH 7,0, EDTA 0,2 mM, β-mercapto-éthanol 2 mM ont été centrifugés à 60 000 rev/min à 20° Centigrade.

TABLEAU I

Coefficients de sédimentation des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités catalytiques

Enzymes	$S_{20\,W}$
ATCase	11,0
2-ThioU-ATCase	11,3
Sous-unités catalytiques	5,5
Sous-unités 2-ThioU-catalytiques	5,5

TABLEAU II

Poids moléculaires des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités catalytiques

Les poids moléculaires ont été déterminés par la méthode de sédimentation à l'équilibr décrite par YPHANTIS / 107 /. Une "cellule Yphantis" à six canaux a été utilisée. La température était de 4° Centigrade. Pour l'étude des ATCases normale et 2-ThioU modifiée, la vitesse était de 12 000 rev/min et pour celle des sous-unités catalytiques de 20 000 rev/min. Les protéines étaient en solution dans un tampon phosphate de potassium, 0,04 M, pH 7, contenant de l'EDTA 0,2 mM et du β-mercapto éthanol 2 mM aux concentrations initiale de 0,2 mg/ml (a), 0,4 mg/ml (b) et 0,6 mg/ml (c).

Les poids moléculaires ont été calculés par une méthode de régression multi-linéaire itérative à l'aide d'un calculateur Wang 720 C.

TABLEAU II

Poids moléculaires des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités catalytiques

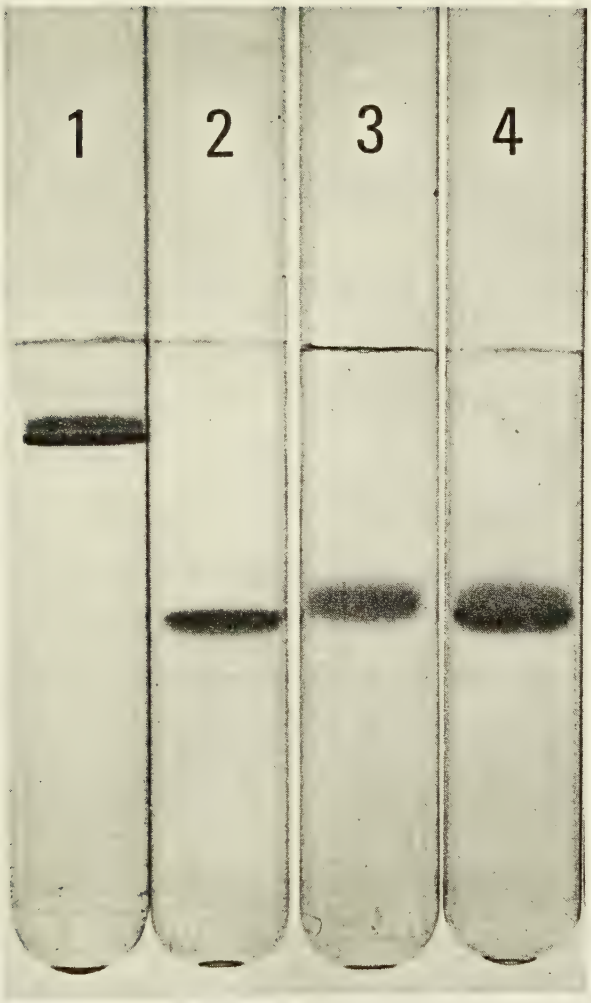
	Poids moléculaires (Daltons)
ATCase	307 000 [a] , 303 000 [b] , 312 000 [c]
2-ThioU-ATCase	319 000 [a] , 309 500 [b] , 303 500 [c]
Sous-unités catalytiques	115 000 [a] , 112 000 [b] , 113 000 [c]
Sous-unités 2-ThioU-catalytiques	115 000 [a] , 112 000 [b] , 110 000 [c]

CLICHE 3

Analyse des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités par électrophorèse sur gels de polyacrylamide.

Les sous-unités 2-ThioU-catalytiques (11 µg) ont été analysées par électrophorèse sur gels contenant 7,5 % de polyacrylamide et 0,2 % de bis-acrylamide, et leur migration comparée à celle des sous-unités catalytiques normales (12 µg) et à celles de 10 µg de chacun des enzymes à partir desquels elles ont été préparées. L'électrophorèse a été réalisée dans un tampon Tris-glycine pH 8,3 selon la technique décrite dans "Méthodes". Les protéines ont été révélées par le bleu Coomassie 0,05 % dans le mélange méthanol/acide acétique/eau (5 : 1 : 5).

1). Mélange des ATCase et 2-ThioU-ATCase ; 2). Sous-unités catalytiques ; 3). Sous-unités 2-ThioU-catalytiques ; 4). Mélange des sous-unités catalytiques et 2-ThioU-catalytiques.


1
2
3
4

1.2 - Vis-à-vis de Certaines Propriétés, la 2-ThioU-ATCase se Comporte comme des Sous-Unités Catalytiques Isolées

Bien que la 2-ThioU-ATCase contienne en proportion normale les deux espèces de sous-unités, elle se comporte vis-à-vis de certains critères comme les sous-unités catalytiques libres. Ceci est le cas pour la dépendance de l'activité vis-à-vis du pH, la thermosensibilité et la perte des interactions homotropes coopératives pour la fixation de l'aspartate.

1.2.1 - Dépendance de l'activité vis-à-vis du pH

GERHART et PARDEE / 54 / ont montré qu'en présence de faibles concentrations en aspartate (5 mM) le pH optimum d'activité des sous-unités catalytiques libres (pH 8,4) est significativement différent du pH optimum d'activité de l'enzyme natif (pH 7). De plus, tandis que le pH optimum d'activité est invariable dans le cas des sous-unités catalytiques isolées quelle que soit la concentration en aspartate, celui de l'ATCase native augmente lorsque la concentration en aspartate augmente / 54 /. Puisque la valeur du pH optimum d'activité évolue vers 8,4 lorsque la concentration en aspartate croît / 54 , 55 /, c'est-à-dire lorsque les sites actifs acquièrent la conformation la plus affine pour les substrats, cette augmentation du pH optimum semble donc liée à l'existence des effets coopératifs.

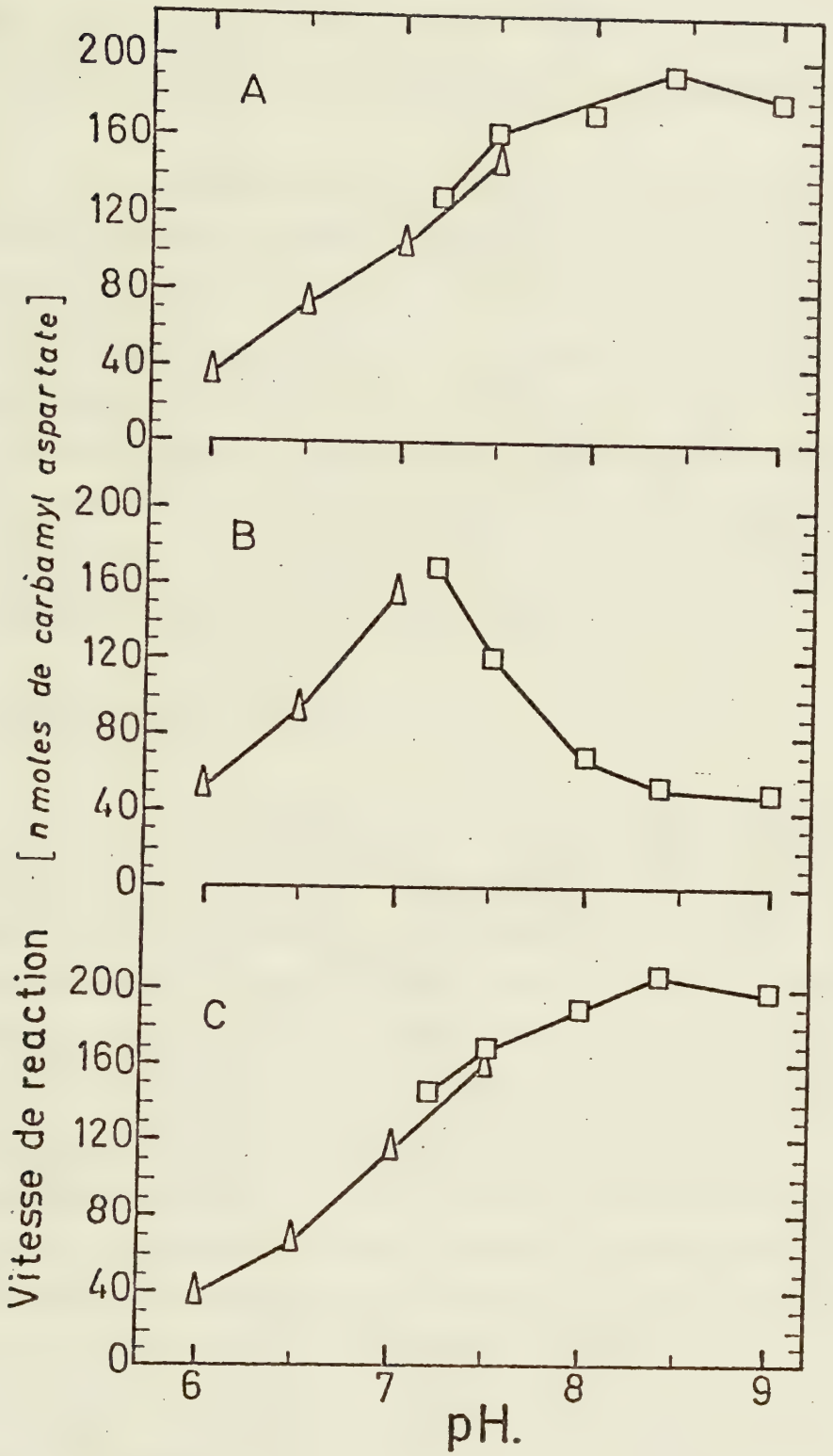
L'étude du pH optimum d'activité en présence d'aspartate 5 mM a été réalisée dans le cas de l'enzyme modifié obtenu en présence de 2-thiouracile. La vitesse initiale de la réaction catalysée par les différentes formes d'enzymes a été déterminée en fonction du pH de la manière suivante : 0,16 μg de sous-unités catalytiques et les extraits cellulaires contenant respectivement les quantités d'ATCase normale et de 2-ThioU-ATCase nécessaires pour obtenir une activité équivalente, ont été testés dans les conditions décrites dans "Méthodes", mais en présence de tampon cacodylate 50 mM (de pH 6 à 7,5) ou en présence de tampon Tris-acétate 50 mM (de pH 7,25 à 9). Les résultats, présentés figure 4, montrent que la courbe d'activité

FIGURE 4

Dépendance vis-à-vis du pH de l'activité de la 2-ThioU-ATCase.

Les activités de 0,16 µg de sous-unités catalytiques, et des quantités équivalentes en activité d'extraits de bactéries déréprimées en absence ou en présence de 500 µg par ml de 2-thiouracile ont été déterminées dans les conditions standards en présence d'aspartate 5 mM, soit dans le tampon cacodylate de sodium 50 mM (- △ - △ -), soit dans le tampon Tris-acétate 50 mM (- □ - □ -).

a) Sous-unités catalytiques ; b) ATCase ; c) 2-ThioU-ATCase.


A
B
C
200
160
120
80
40
0
6
7
8
9
pH.
Vitesse de reaction [n moles de carbamyl aspartate]

en fonction du pH de la 2-ThioU-ATCase est semblable à celle des sous-unités catalytiques libres et non à celle de l'ATCase. Nous verrons plus loin que cette propriété de la 2-ThioU-ATCase coïncide avec la perte des interactions homotropes.

Cette propriété, qui a été vérifiée de nombreuses fois sur les préparations de 2-ThioU-ATCase en extraits cellulaires et purifiée s'est révélée utile à l'analyse rapide du matériel actif synthétisé dans différentes conditions expérimentales, en déterminant le rapport des activités aspartate transcarbamylases aux pH 7 et pH 8,4. Ce rapport a une valeur reproductible de 0,7 $\pm$ 10 % pour la 2-ThioU-ATCase, qu'elle soit pure ou en extrait cellulaire. Dans le cas de l'ATCase normale, ce rapport est de l'ordre de 5, à la fois dans les extraits cellulaires et les solutions concentrées d'enzyme purifié . Cependant il a été observé qu'au cours de la conservation de l'ATCase à 4° en solution diluée, ce rapport diminue progressivement vers 2.

1.2.2 - Thermosensibilité

1,2 μg de sous-unités catalytiques et les extraits cellulaires contenant respectivement les quantités d'ATCase normale et de 2-ThioU-ATCase nécessaires pour obtenir une activité équivalente ont été incubés dans 0,5 ml de tampon phosphate de potassium 40 mM, pH 7,0 à 60°C durant 6 heures. Des échantillons de 50 μl ont été prélevés à intervalles de temps variables et leurs activités en ATCase testées dans les conditions standards. Les résultats, présentés figure 5, montrent que la thermosensibilité de la 2-ThioU-ATCase est la même que celle des sous-unités catalytiques libres. L'activité de l'ATCase, qui est dans ces conditions beaucoup plus stable, croît significativement au cours des deux premières heures d'incubation. Ce phénomène doit être lié à une dissociation de l'enzyme en sous-unités, favorisant la catalyse au niveau des sites catalytiques. GERHART et PARDEE avaient en effet observé pour cette concentration en aspartate, une meilleure activité de l'ATCase après un court chauffage à 60°C, conjointement à l'abolition des interactions entre sous-unités responsables des effets coopératifs pour la liaison de l'aspartate / 2 /.

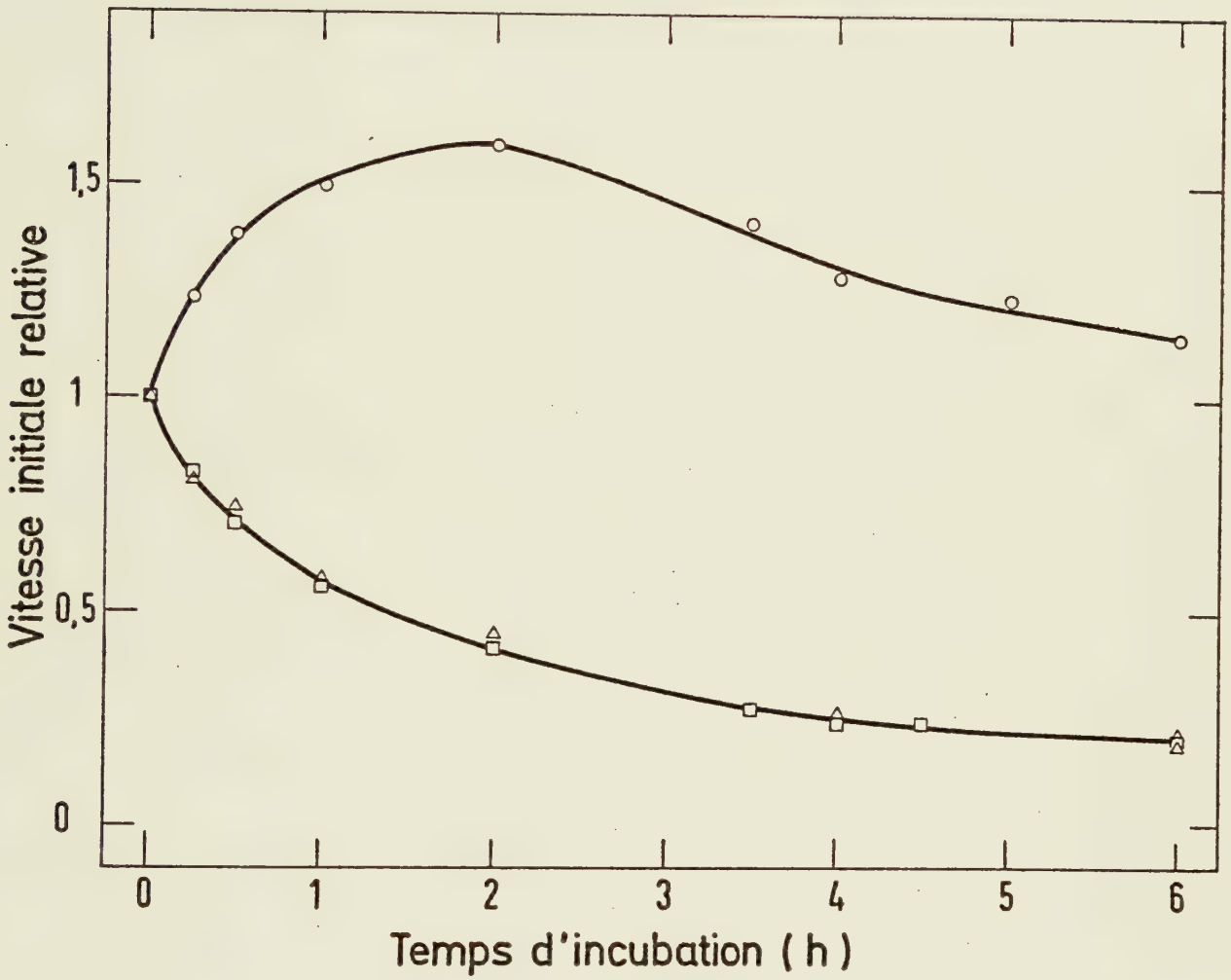
L'ensemble de ces résultats suggère que la 2-ThioU-ATCase présente une structure plus "lâche" que celle de l'ATCase normale. Ainsi dans l'enzyme modifié,

FIGURE 5

Thermosensibilité de la 2-ThioU-ATCase.

Des solutions (2,4 µg par ml) de sous-unités catalytiques, et de quantités équivalentes en activité d'extraits de bactéries déréprimées en absence ou en présence de 500 µg par ml de 2-thiouracile ont été incubés à 60°C pendant 6 heures, dans un tampon phosphate de potassium 0,04, pH 7. Des échantillons de 50 µl ont été prélevés et analysés pour leur activité aspartate transcarbamylase dans les conditions standards.

(–o–o–) ATCase normale ; (- Δ - Δ -) Sous-unités catalytiques ;
(- □ - □ -) 2-ThioU-ATCase.


Vitesse initiale relative
1,5
1
0,5
0
0
1
2
3
4
5
6
Temps d'incubation (h)

les sous-unités catalytiques doivent-elles se trouver dans un état conformationnel plus proche de leur structure à l'état libre que dans l'enzyme normal. Nous verrons plus loin que la perte de certaines propriétés allostériques de la 2-ThioU-ATCase confirme cette hypothèse.

1.3 - Abolition des Interactions Homotropes Coopératives entre Molécules d'Aspartate

Les interactions homotropes coopératives entre sites catalytiques pour la fixation du substrat aspartate (interactions qui disparaissent après dissociation de l'enzyme en sous-unités), ayant été largement démontrées dans le cas de l'ATCase normale / 56 /, il était intéressant d'étudier l'éventualité de l'existence de tels effets coopératifs dans le cas de la 2-ThioU-ATCase.

Deux moyens d'étude ont été utilisés et ont montré, comme l'indiquent les résultats décrits ci-après, que les interactions homotropes sont abolies dans la 2-ThioU-ATCase.

1.3.1 - Etude de l'activité de la 2-ThioU-ATCase en fonction de la concentration en aspartate

Il a été démontré que le mécanisme de catalyse au niveau du site actif de l'ATCase implique que la fixation du carbamyl phosphate précède celle de l'aspartate / 35 , 57 , 58 /. A l'aide de méthode de "sauts de température", HAMMES et WU / 59 / ont déterminé une constante d'équilibre de dissociation de 4×10^{-5} M pour le carbamyl phosphate, ce qui est identique à la valeur obtenue pour les sous-unités catalytiques isolées. En présence de concentrations saturantes de carbamyl phosphate, des effets homotropes positifs (interactions coopératives entre les sites catalytiques) sont observés par suite de la fixation de l'aspartate. Ces effets homotropes sont mis en évidence en déterminant les vitesses initiales de la réaction enzymatique pour des molarités croissantes en substrat aspartate. La courbe des vitesses initiales en fonction des concentrations en aspartate ainsi obtenue dans le cas de l'ATCase normale de E. Coli a une forme sigmoïde caractéristique / 56 /. Ce type d'étude a été réalisé dans le cas de la 2-ThioU-ATCase et de l'ATCase normale comme témoin.

0,50 µg de 2-ThioU-ATCase purifiée, 0,25 µg d'ATCase normale et 0,135 µg de sous-unités catalytiques ont été incubées dans les conditions standards

en présence de concentrations croissantes de $\left[^{14}C\right]$ -aspartate (de 0,7 mM à 25 mM). Sur la figure 6 (a), l'enzyme natif normal montre dans ces conditions la courbe sigmoïde caractéristique des interactions homotropes coopératives, tandis que ces interactions sont inexistantes dans les cas des sous-unités catalytiques libres et de la 2-ThioU-ATCase. La représentation réciproque correspondante, selon LINEWEAVER-BURK / 60 / est présentée figure 6 (b). Les droites, correspondant à la 2-ThioU-ATCase et aux sous-unités catalytiques sont significatives de représentations inverses d'hyperboles / 60 /. La variation des vitesses initiales en fonction des concentrations en substrat peut donc, dans ces deux cas, être interprétée selon une cinétique de MICHAËLIS-MENTEN / 39 /. La courbe sigmoïde caractéristique des enzymes allostériques est, par contre, observée dans le cas de l'ATCase normale.

Ainsi, l'étude de l'activité en fonction de concentrations croissantes en aspartate démontre l'absence d'interactions homotropes coopératives pour la fixation de l'aspartate dans la 2-ThioU-ATCase.

Lorsque les résultats sont exprimés par mg de sous-unités catalytiques (encart figure 6 b), la 2-ThioU-ATCase manifeste une activité inférieure à celle des sous-unités catalytiques. Cette activité inférieure des sous-unités catalytiques dans la 2-ThioU-ATCase peut résulter de deux phénomènes : d'une part, ces sous-unités, bien qu'ayant une activité intrinsèque normale, pourraient du fait des interactions dues à leur association aux sous-unités 2-ThioU-régulatrices, manifester une activité inférieure à la normale ; d'autre part, les sous-unités 2-ThioU-catalytiques pourraient être modifiées de telle sorte que leur activité soit inférieure à celle des sous-unités catalytiques.

Il était donc important d'examiner après dissociation de la 2-ThioU-ATCase l'activité des sous-unités 2-ThioU-catalytiques, afin de déterminer si la disparition des interactions entre sous-unités restaure l'activité caractéristique des sous-unités catalytiques isolées. Cette étude a été réalisée et fait l'objet du paragraphe 3.1.2.1, Chapitre 3.

FIGURE 6 a

Absence d'interactions coopératives entre molécules d'aspartate dans la 2-ThioU-ATC

0,5 µg de 2-ThioU-ATCase (- □ - □ -), 0,25 µg d'ATCase normale (- o - o -) et 0,135 µg de sous-unités catalytiques (- Δ - Δ -), ont été incubées dans les conditions standards, mais en présence de quantités croissantes de $[^{14}C]$-aspartate (de 7×10^{-4} M à $2,5 \times 10^{-2}$ M).

Représentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en aspartate.

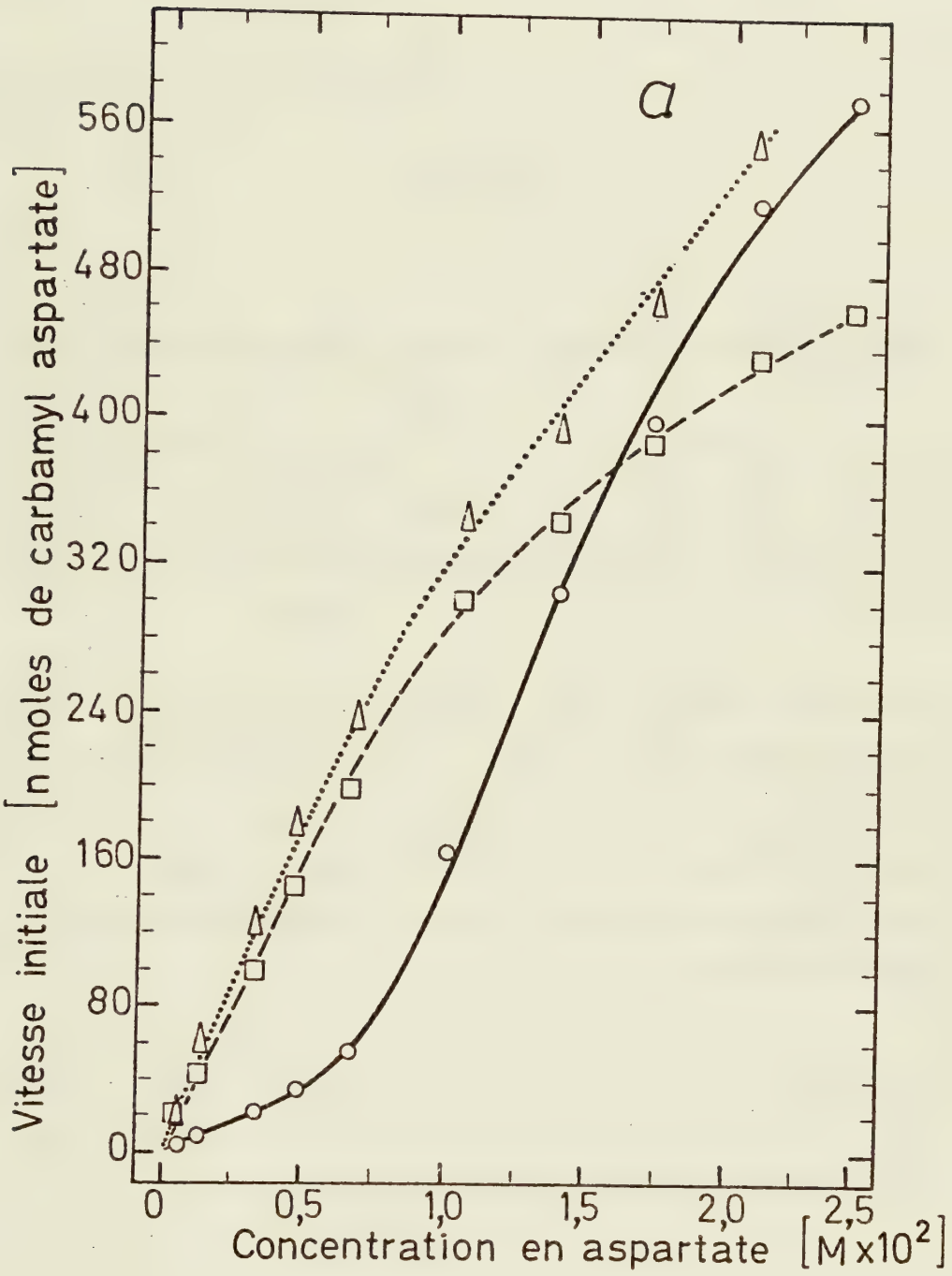

a
560
480
400
320
240
160
80
0
Vitesse initiale [n moles de carbamyl aspartate]
0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
Concentration en aspartate [M x10²]

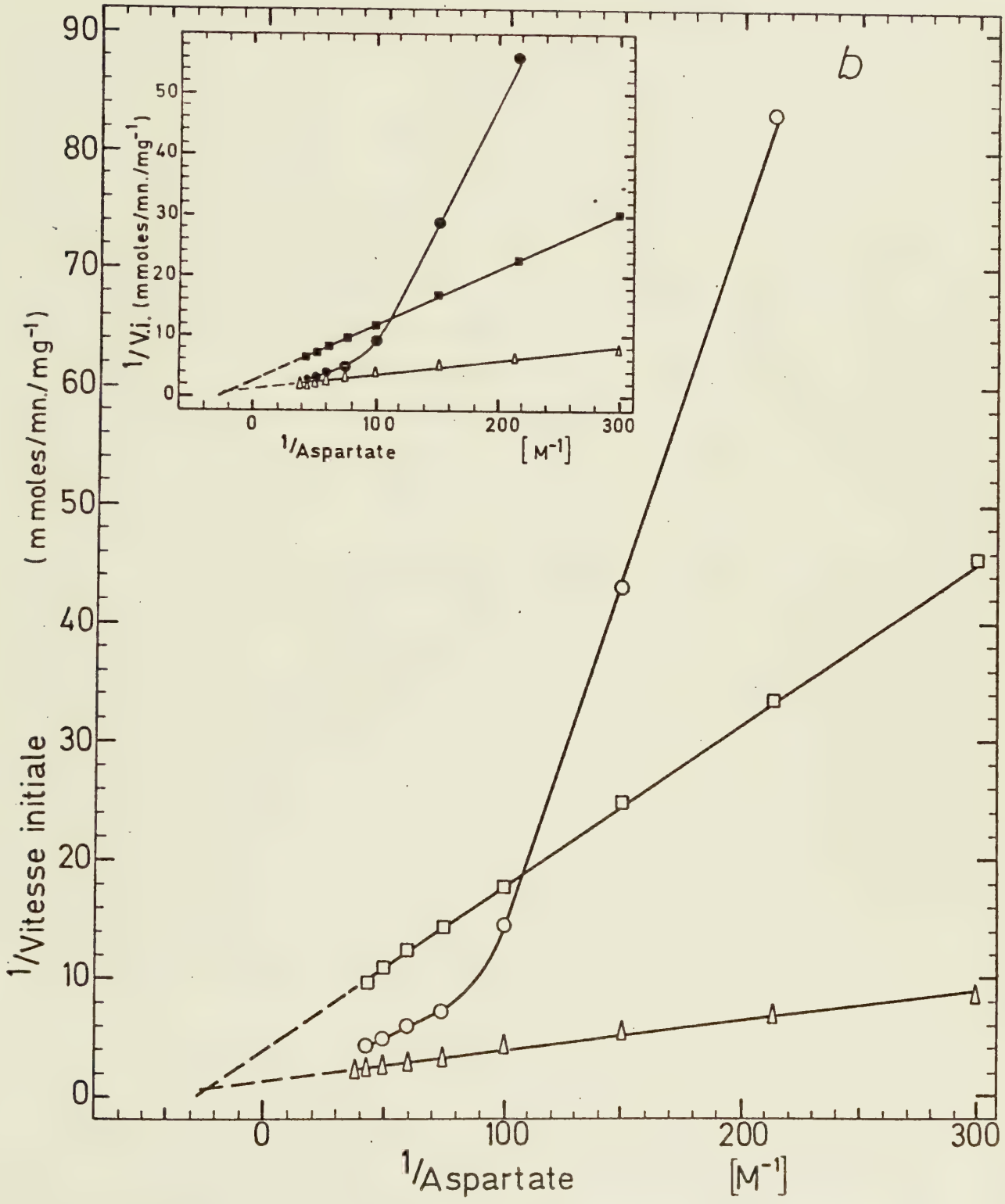
Figure 6 b

Absence d'interactions coopératives entre molécules d'aspartate dans la 2-ThioU-ATC

0,5 µg de 2-ThioU-ATCase (- □ - □ -), 0,25 µg d'ATCase normale (-o -o -) et 0,135 µg de sous-unités catalytiques (- Δ - Δ -), ont été incubées dans les conditions standards, mais en présence de quantités croissantes de $\left[^{14}C\right]$ -aspartate (de 7×10^{-4} M à $2,5 \times 10^{-2}$ M).

Représentation réciproque selon LINEWEAVER et BURK / 60 / à partir des résultats représentés sur la figure 6 a : sur les courbes principales, les vitesses initiales sont exprimées en mmoles de carbamyl-aspartate formées, par minute, par mg de protéines. Dans l'encart figurent les résultats obtenus lorsque ces mêmes vitesses initiales sont exprimées en mmoles de carbamyl-aspartate formées par minute et par mg de sous-unités catalytiques.

Par analogie avec la proportion des sous-unités catalytiques dans l'ATCase native / 4 il a été admis que les sous-unités 2-ThioU-catalytiques contenues dans la 2-ThioU-ATCase représentent 68 % du poids de l'enzyme natif.


b
1/Vitesse initiale (m moles/mn./mg⁻¹)
1/Aspartate [M⁻¹]
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
200
300
1/Vi. (m moles/mn./mg⁻¹)
1/Aspartate [M⁻¹]

1.3.2 - Contrairement à celle de l'ATCase, l'activité de la 2-ThioU-ATCase n'est pas stimulée par le PALA

Dans certaines conditions, les analogues du substrat aspartate peuvent induire les interactions homotropes coopératives entre les sites catalytiques dans l'ATCase. L'activité, mesurée lorsque les concentrations en aspartate sont faibles, est en effet stimulée en présence de faibles concentrations d'inhibiteurs compétitifs tels que le maléate et le succinate en présence de carbamylphosphate, ou le N-(phosphonacétyl)-L-aspartate (PALA) / 61 , 62 , 63 /. Ceci provient du fait que ces analogues sont capables, au même titre que l'aspartate, d'induire par leur fixation aux sites actifs le changement conformationnel vers la structure la plus affine pour les substrats. Puisque l'activité enzymatique de la 2-ThioU-ATCase en fonction de l'aspartate est représentée par une courbe hyperbolique, indiquant l'absence d'interactions homotropes coopératives, une telle stimulation de l'activité par les analogues de substrats ne devrait pas être observée.

Afin d'analyser cette hypothèse, l'influence du PALA sur l'activité de la 2-ThioU-ATCase a été étudiée, comparativement à l'ATCase et aux sous-unités catalytiques. Le PALA est une molécule qui, comme le montre la figure 7, combine les principales fonctions chimiques des deux substrats naturels de l'ATCase. Ce composé, décrit et synthétisé par COLLINS et STARK / 63 /, se lie avec une affinité 1 000 fois supérieure à celle du carbamylphosphate au site actif de l'ATCase, et induit un changement conformationnel de l'enzyme analogue, selon les études spectrophotométriques à celui qui est provoqué par la fixation simultanée du carbamylphosphate et du succinate (analogue du L-aspartate). Le PALA est donc considéré comme un "analogue d'état de transition" dans la réaction catalysée par l'enzyme.

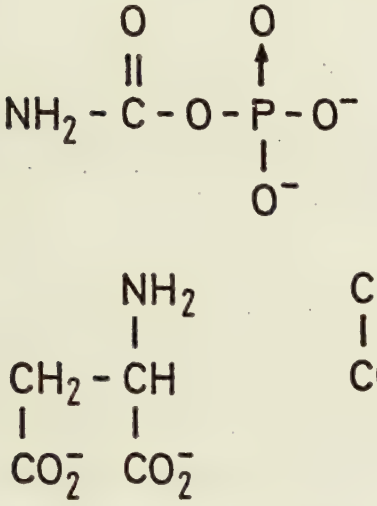
Les pourcentages d'inhibition en fonction de concentrations croissantes en PALA, mesurés en présence de carbamylphosphate 5 mM et d'aspartate 1 mM sont représentés sur la figure 8. Ces résultats montrent que la 2-ThioU-ATCase se comporte exactement comme les sous-unités catalytiques, qu'elles soient normales ou 2-ThioU-modifiées, en ce sens qu'aucune stimulation de l'activité n'est observée. Par contre,

FIGURE 7

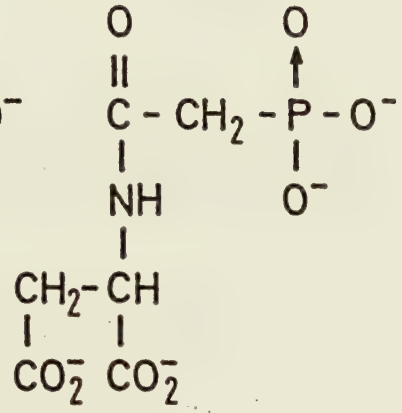
Structure du N-(phosphonacétyl)-L-aspartate.

La structure de ce composé est ici comparée à celle des substrats et du produit de la réaction catalysée par l'aspartate transcarbamylase (selon COLLINS et STARK / 63 /).

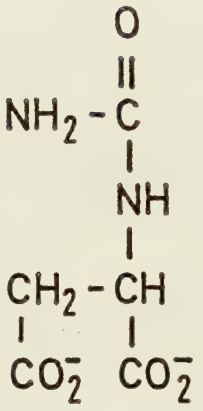
CARBAMYL PHOSPHATE



L - ASPARTATE



N - (PHOSPHONACETYL) - L - ASPARTATE



CARBAMYL - L - ASPARTATE

PHOSPHATE

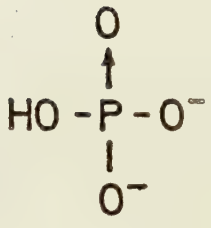
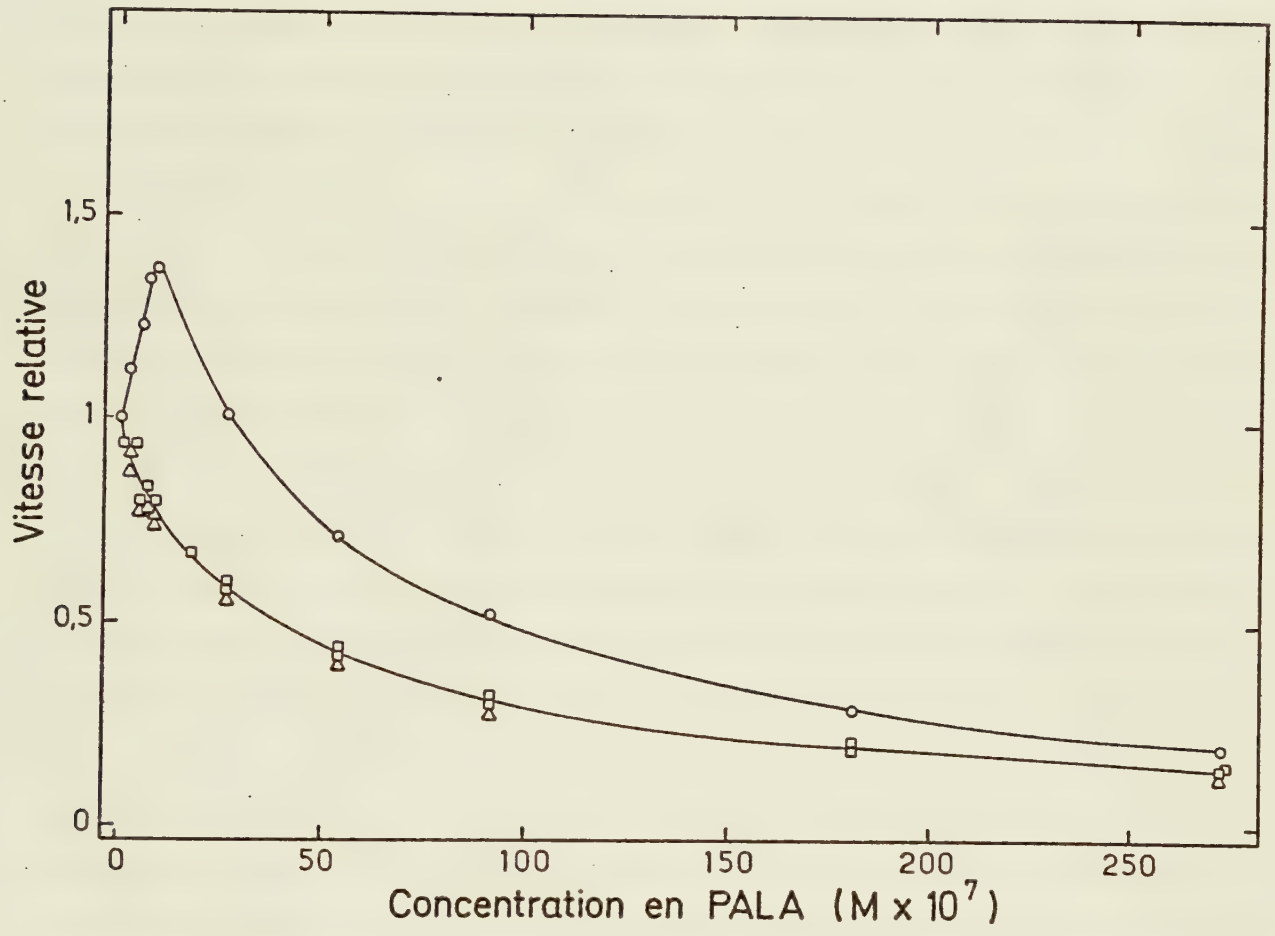


FIGURE 8

Activités enzymatiques des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités catalytiques en fonction de la concentration en PALA.

0,7 µg d'ATCase (o – o), 1,8 µg de 2-ThioU-ATCase (□ – □) et 0,5 µg de sous-unités catalytiques (△ – △) ont été incubés dans les conditions décrites dans "Méthodes" en présence d'aspartate 1 mM, de carbamyl-phosphate 5 mM et de concentrations croissantes en PALA. La courbe obtenue lorsque les sous-unités 2-ThioU-catalytiques sont incubées dans les mêmes conditions, est superposée à celle qui correspond aux sous-unités catalytiques et à la 2-ThioU-ATCase.


Vitesse relative
1,5
1
0,5
0
0
50
100
150
200
250
Concentration en PALA (M x 10⁷)

l'ATCase est très significativement stimulée par le PALA 0,9 µM, comme l'avaient observé COLLINS et STARK / 63 /. Ce résultat apporte une preuve supplémentaire de la disparition des interactions homotropes coopératives entre sites catalytiques dans la 2-ThioU-ATCase. Dans tous les cas, pour les concentrations en PALA supérieures à 3 µM, un effet d'inhibition est observé.

COLLINS et STARK / 63 / ont montré que le PALA inhibe les sous-unités catalytiques isolées par compétition avec le carbamylphosphate, mais non avec l'aspartate. Ce processus de compétition a été étudié dans le cas de l'ATCase normale et de la 2-ThioU-ATCase. Les résultats, présentés figure 9 selon la représentation inverse de LINEWEAVER et BURK / 60 / montrent que le PALA agit de façon analogue sur l'activité de la 2-ThioU-ATCase (figure 9 a) et des sous-unités catalytiques (figure 9 b), comme inhibiteur compétitif. Il apparaît à nouveau figure 9 c que le PALA stimule l'activité de l'ATCase normale, mais qu'il agit en même temps comme inhibiteur compétitif du carbamylphosphate. La vitesse initiale extrapolée à la valeur maximum de 5 mmoles/min/g d'ATCase en absence de PALA devient égale à 17 mmoles/min/g en sa présence (figure 9 c). Puisque les sous-unités catalytiques représentent les deux tiers de l'ATCase, on peut calculer que cette vitesse initiale maximale correspond à 25 mmoles/min/g de sous-unités catalytiques. Cette valeur est très proche de celle qui est obtenue dans le cas des sous-unités catalytiques isolées (figure 9 b). Dans le cas de l'ATCase, la ligne droite obtenue en présence de PALA 0,9 µM, concentration la plus efficace pour la stimulation de l'activité enzymatique coupe l'axe des ordonnées à la même vitesse initiale maximale que la ligne droite qui correspond à la concentration en PALA de 5,4 µM. Ce résultat est caractéristique d'une inhibition compétitive.

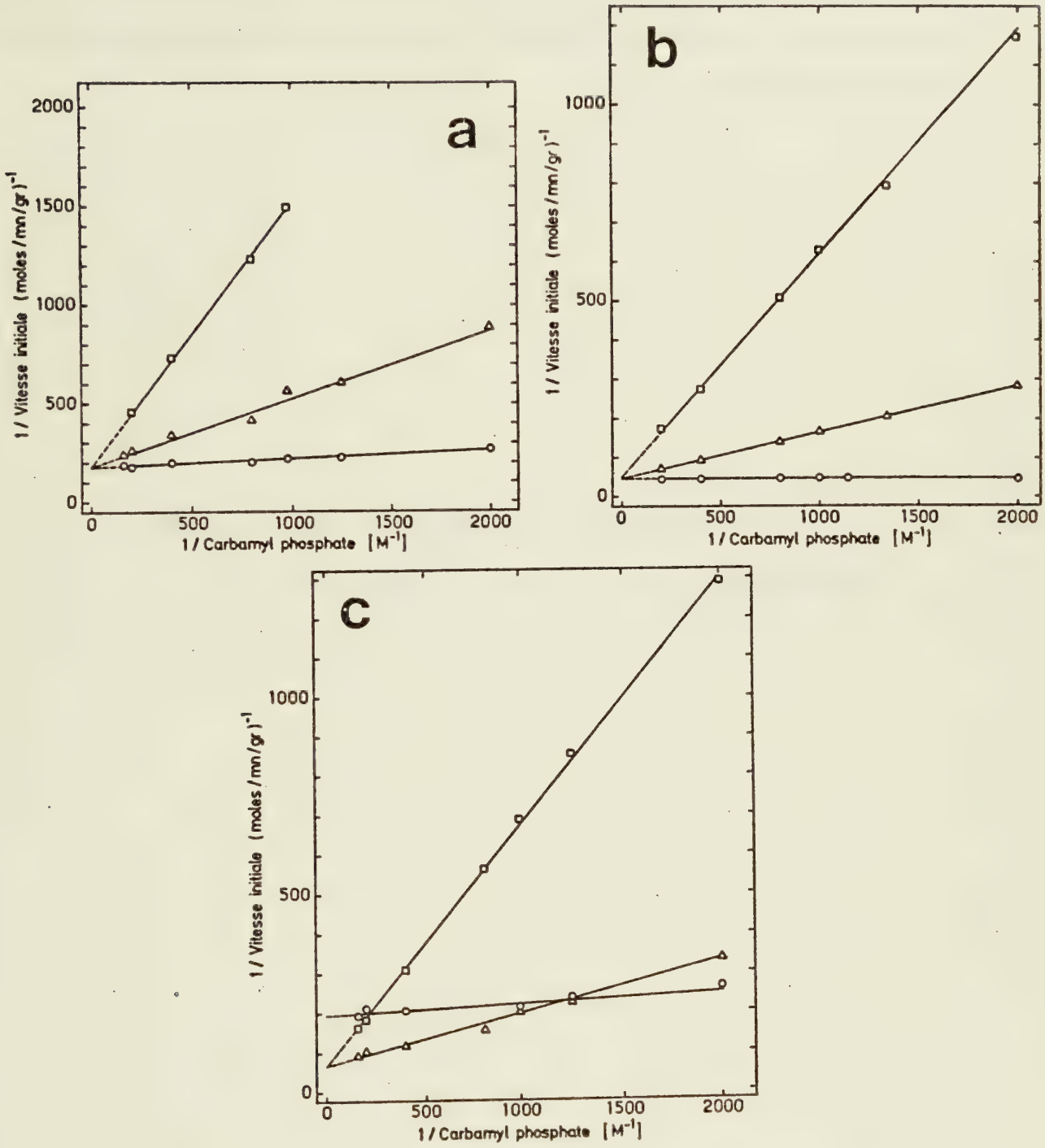
Ainsi, contrairement à l'ATCase qui est transconformée d'une forme de faible affinité ("état contraint") en une forme de forte affinité ("état relâché") du fait de la transition allostérique provoquée par la liaison de l'aspartate (ou de ses analogues)

FIGURE 9

Compétition du PALA vis-à-vis du carbamyl-phosphate pour les ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et les sous-unités catalytiques.

0,6 µg à 1 µg d'ATCase, 1,3 µg à 3,9 µg de 2-ThioU-ATCase, et 0,14 µg à 0,57 µg de sous-unités catalytiques ont été incubées dans les conditions décrites dans "Méthodes" en présence d'aspartate 1 mM et de concentrations croissantes de carbamyl phosphate de 0,5 mM à 6,2 mM dans le tampon cacodylate de sodium 0,05 M, pH 7. Les vitesses initiales ont été déterminées soit en absence de PALA (o – o) ou en sa présence aux concentrations de 0,9 µM (Δ - Δ) ou 5,4 µM (□ - □).

a) 2-ThioU-ATCase ; b) Sous-unités catalytiques ; c) ATCase.


a
b
c
1 / Vitesse initiale (moles / mn / gr)$^{-1}$
1 / Carbamyl phosphate [M^{-1}]
0
500
1000
1500
2000

au(x) premier(s) site(s), la 2-ThioU-ATCase possède, vis-à-vis de ce substrat une affinité constante. La présence de forte concentration en aspartate ne peut modifier cette affinité, ce qui indique l'absence d'interactions homotropes coopératives dans la 2-ThioU-ATCase.

2 - LA 2-THIOURACILE-ASPARTATE TRANSCARBAMYLASE EST UN ENZYME SENSIBLE AUX EFFECTEURS ALLOSTERIQUES

L'interaction de l'ATCase avec ses substrats est modulée par les effets hétérotropes associés à la liaison de nucléotides effecteurs aux sites régulateurs. Ces nucléotides effecteurs, CTP et ATP n'altèrent pas la vitesse maximum de la courbe de saturation de l'ATCase par l'aspartate, mais modifient la sigmoïdicité de cette courbe qui apparaît plus sigmoïde en présence du rétroinhibiteur CTP, et moins sigmoïde en présence de l'activateur ATP / 2 , 61 /. Les interactions homotropes entre sites catalytiques pour l'aspartate, et la sensibilité envers les nucléotides effecteurs sont les propriétés caractéristiques par lesquelles l'ATCase manifeste son rôle régulateur. Puisque les traitements qui, sans altérer l'activité catalytique de l'enzyme, abolissent les effets homotropes, provoquent aussi la disparition des effets hétérotropes, il était intéressant d'examiner si la 2-ThioU-ATCase native qui ne manifeste plus d'interactions coopératives entre sites catalytiques avait également perdu la sensibilité au CTP et à l'ATP, respectivement rétroinhibiteur et stimulateur de l'ATCase normale.

2.1 - L'Activité de la 2-ThioU-ATCase est Inhibée par le CTP

L'influence du CTP sur les propriétés catalytiques de la 2-ThioU-ATCase, et les modifications structurales liées à la fixation de ce nucléotide ont été analysés et comparés à ceux observés dans le cas de l'ATCase.

2.1.1 - La rétroinhibition de la 2-ThioU-ATCase dépend de la concentration en CTP

La possibilité de rétroinhibition par le CTP de la 2-ThioU-ATCase a été étudiée et comparée à celle de l'ATCase.

Un µg de 2-ThioU-ATCase, 0,5 µg d'ATCase normale et 0,65 µg de sous-unités catalytiques ont été incubés, comme indiqué dans "Méthodes", en présence de concentrations croissantes de CTP (de 0,01 mM à 2 mM) et les vitesses initiales des réactions enzymatiques déterminées. La figure 10 dans laquelle les pourcentages d'inhibition sont exprimés en fonction de la concentration en CTP, montre que ce nucléotide rétroinhibe l'activité de la 2-ThioU-ATCase, et que comme pour l'ATCase normale, cette inhibition augmente avec la molarité en CTP. L'effet de chaque concentration en CTP sur la 2-ThioU-ATCase est de 68,5 $\pm$ 1 % ce qu'il est dans le cas de l'ATCase normale. Le CTP est sans effet sur l'activité des sous-unités catalytiques, hormis une légère inhibition indépendante de la concentration en nucléotides. Un tel phénomène a déjà été mentionné par WEITZMANN et WILSON / 55 / et PORTER, MODEBE et STARK / 35 /.

Ces résultats indiquent que dans l'ATCase modifiée synthétisée en présence de 2-thiouracile, les interactions hétérotropes correspondant à la rétroinhibition par le CTP sont largement présentes, bien que les interactions homotropes entre molécules d'aspartate soient inexistantes.

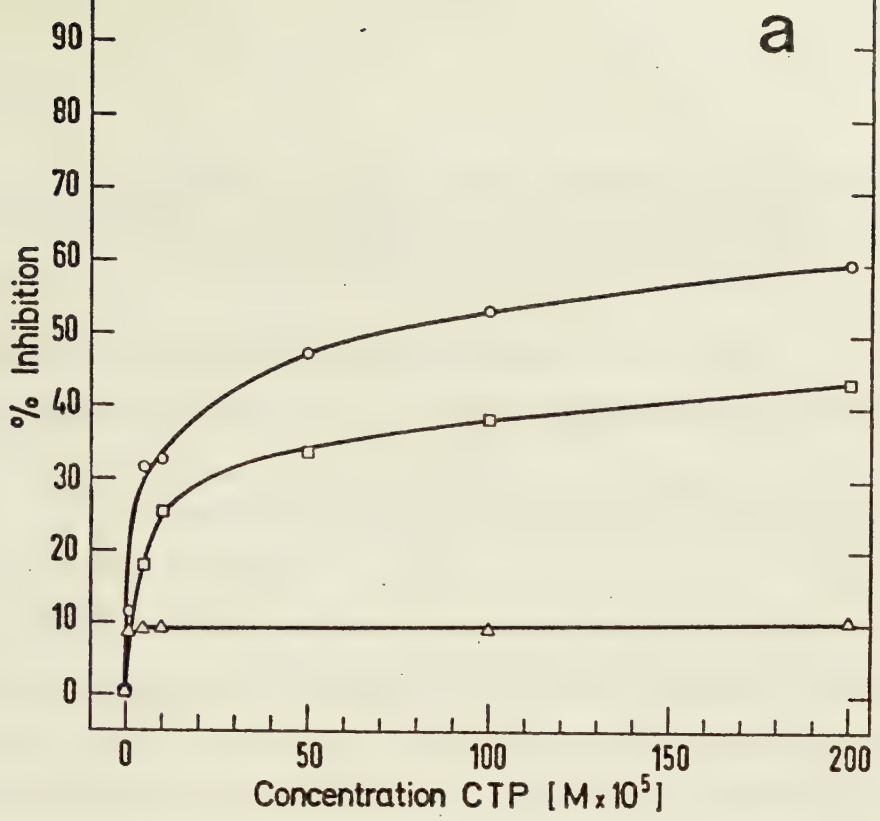
FIGURE 10

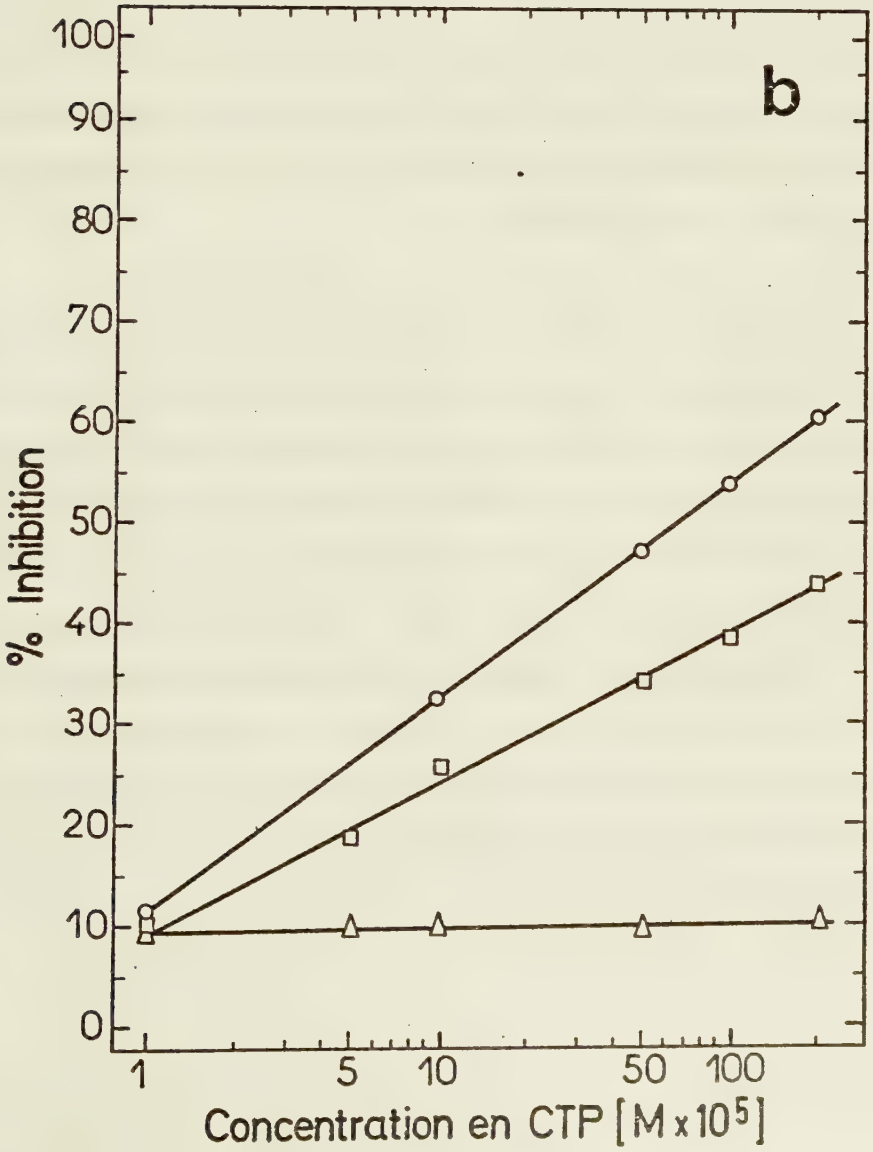
Rétroinhibition de la 2-ThioU-ATCase en fonction de la concentration de CTP.

Un µg de 2-ThioU-ATCase (- □ - □ -), 0,5 µg d'ATCase normale (- o - o -) et 0,65 µg de sous-unités catalytiques (- Δ - Δ -) ont été incubés dans les conditions exposées dans "Méthodes", en présence de quantités croissantes de CTP (de 0,01 à 2 mM).

a) Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en CTP.

b) Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration en CTP.


a
% Inhibition
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
0
50
100
150
200
Concentration CTP [M x 10^5]


b
% Inhibition
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
1
5
10
50
100
Concentration en CTP [M x 10^5]

2.1.2 - Les interactions coopératives entre sites catalytiques ne réapparaissent pas en présence de fortes concentrations en CTP

Selon les deux modèles qui ont été proposés pour rendre compte du compor tement des enzymes allostériques / 19 , 20 /, les substrats et rétroinhibiteurs agissent en induisant des changements de structure vers des conformations ayant une plus grande ou une plus faible affinité pour le substrat.

Concernant les propriétés de la 2-ThioU-ATCase, deux hypothèses pouvai être faites pour expliquer l'absence des interactions coopératives entre sites catalytique

a) La 2-ThioU-ATCase pouvait être un enzyme "gelé" dans la (ou les) conformation (s) ayant la plus grande affinité pour l'aspartate, c'est-à-dire la conformation R en terme du modèle "concerté" / 19 /, ou la conformation B en terme du modèle "séquentiel" / 20 /. Cet enzyme serait incapable d'atteindre la conformation ayant une faible affinité pour l'aspartate (conformation T ou A selon le modèle considéré). Dans ce cas, en présence du rétroinhibiteur CTP, les interactions coopératives entre sites catalytiques ne réapparaîtraient pas.

b) Au contraire, selon une seconde hypothèse, la 2-ThioU-ATCase serait capable d'atteindre la (ou les) conformation (s) possédant une affinité plus faible pour le substrat. Cet enzyme modifié se caractériserait donc par une faible constante allostérique L (= T / R dans le cas du modèle concerté), correspondant à un équilibre anormalement en faveur de la forme possédant l'affinité la plus grande pour le substrat. Dans ce cas, si le CTP agit sur l'équilibre entre les deux formes d'affinités différentes pour l'aspartate, le rétroinhibiteur devrait rétablir l'existence des interactions homotropes coopératives entre sites catalytiques. Seulement si en présence de CTP les effets coopératifs entre sites catalytiques ne réapparaissent pas, pourra-t-il être dit que les interactions homotropes entre ces sites et les interactions hétérotropes ont été dissociées dans l'ATCase modifiée.

Afin d'observer une éventuelle réapparition des interactions homotropes entre sites catalytiques pour l'aspartate sous l'influence du CTP, une étude de l'activité enzymatique de la 2-ThioU-ATCase en fonction de la molarité en substrat a été réalisée en présence d'une forte concentration en rétroinhibiteur. Les propriétés catalytiques de l'ATCase ont été comparativement analysées dans les mêmes conditions.

Ces expériences ont été effectuées à pH 8, conditions particulièrement favorables à l'observation des interactions coopératives dans l'ATCase normale, et en présence de CTP 10^{-2} M, concentration qui inhibe la 2-ThioU-ATCase et l'ATCase de 55% et 80 % respectivement, en présence d'aspartate 5 mM. La figure 11 a présente la courbe obtenue en portant les vitesses initiales en fonction des molarités en aspartate dans ces conditions. La sigmoïdicité de la courbe correspondant à l'ATCase normale est clairement accentuée, comme l'ont auparavant observé GERHART et PARDEE / 2 /, au contraire la 2-ThioU-ATCase se comporte toujours selon une cinétique hyperbolique de type MICHAËLIS-MENTEN, montrant que la présence d'une concentration en CTP fortement inhibitrice ne provoque pas la réapparition d'interactions coopératives entre sites catalytiques.

Le coefficient d'interaction entre sites catalytiques a été en outre déterminé en exprimant selon la représentation de HILL / 64 / les résultats d'une expérience analogue réalisée à pH 7, condition qui permet une meilleure approximation des vitesses maximales. La figure 11 b montre que le coefficient augmente dans le cas de l'ATCase lorsque la molarité en aspartate croît, et atteint la valeur de 3,8 pour une molarité en aspartate de 2×10^{-2} M, tandis que sa valeur demeure invariablement égale à 1 dans le cas de la 2-ThioU-ATCase, montrant l'absence complète dans cet enzyme modifié, d'interactions coopératives entre sites catalytiques.

Ceci indique que, si le CTP agit en réservant un équilibre entre des conformations ayant une grande et une faible affinité pour l'aspartate, ces conformations doivent être distinctes de celles qui sont impliquées dans les interactions coopératives entre sites catalytiques.

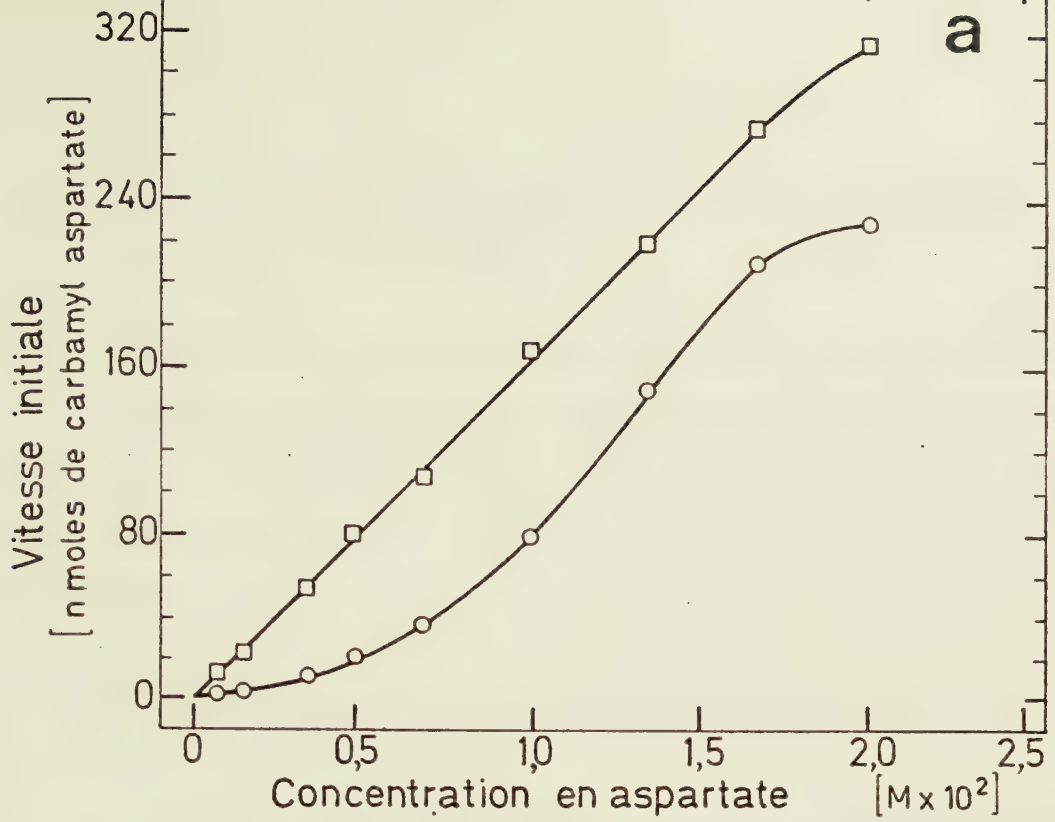
FIGURE 11

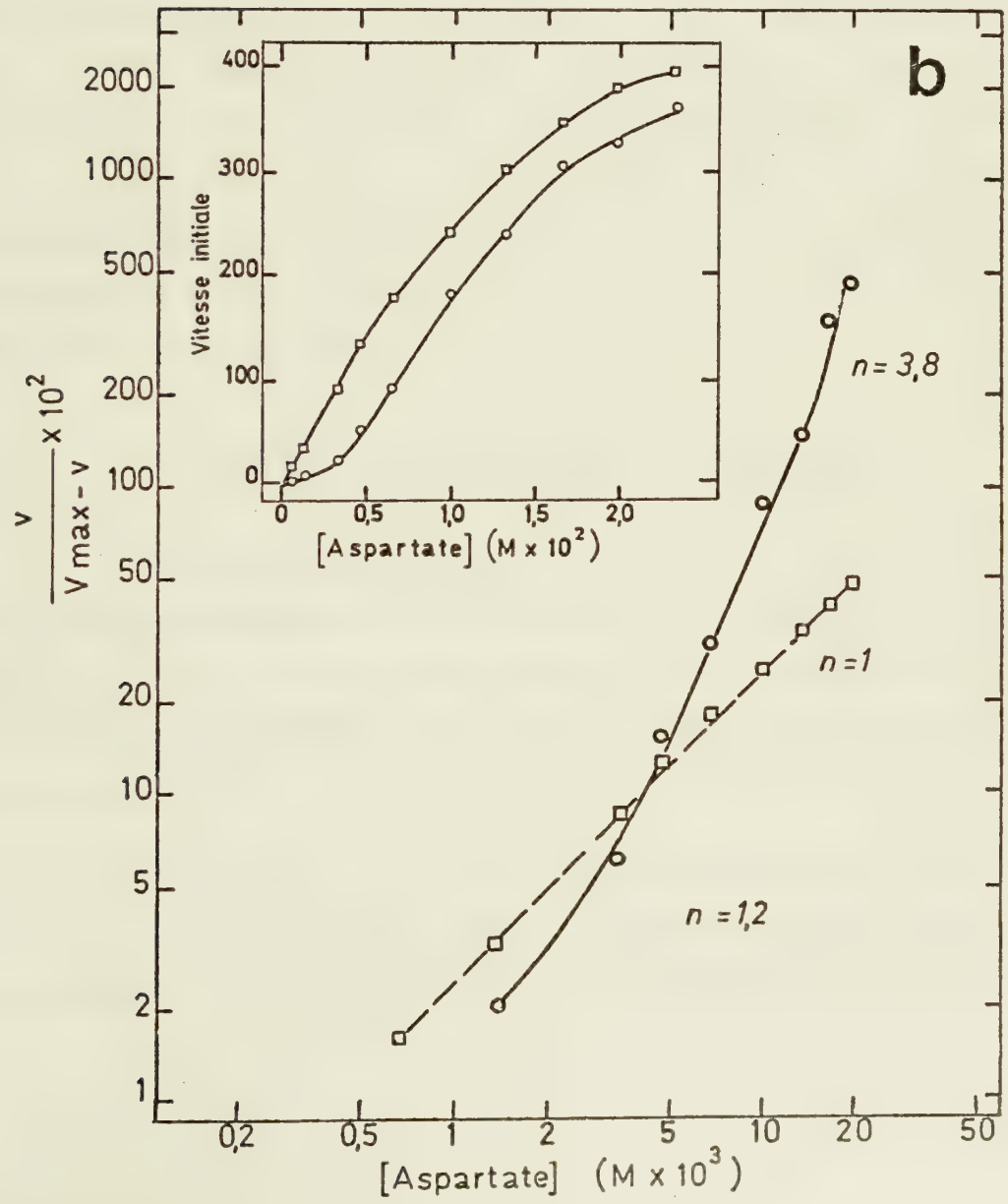
Absence d'interactions coopératives entre sites catalytiques de la 2-ThioU-ATCase en présence de fortes concentrations en CTP.

a) 0,5 µg de 2-ThioU-ATCase (- □ - □ -), et 0,25 µg d'ATCase (- o - o -) ont été incubés dans les conditions standards, dans un tampon Tris-acétate 50 mM, pH 8, mais en présence de CTP 10^{-2} M et de concentrations croissantes en aspartate (de 0,7 mM à 25 mM).

b) Courbes d'encart : Même expérience mais dans un tampon cacodylate de sodium 50 mM, pH 7. 1 µg de 2-ThioU-ATCase a été utilisé pour chaque test en présence de CTP 3,3 mM (- □ - □ -), et 0,3 µg d'ATCase en présence de CTP 2 mM (- o - o -).

Courbes principales : Représentations de HILL / 64 / correspondantes ; les vitesses maxima ont été estimées par extrapolation des courbes obtenues selon la représentation inverse de LINEWEAVER et BURK / 60 /. Les activités ont été mesurées en présence de concentrations en aspartate supérieures à celles qui sont ici rapportées, dans le but d'atteindres les vitesses maxima.


a
Vitesse initiale
[n moles de carbamyl aspartate]
320
240
160
80
0
0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
Concentration en aspartate
[M x 10²]


b
v / Vmax - v x 10²
2000
1000
500
200
100
50
20
10
5
2
1
0,2
0,5
1
2
5
10
20
50
[Aspartate] (M x 10³)
n = 3,8
n = 1
n = 1,2
Vitesse initiale
400
300
200
100
0
0
0,5
1,0
1,5
2,0
[Aspartate] (M x 10²)

2.1.3 - Les modalités de l'inhibition par le CTP sont les mêmes pour l'ATCase normale et la 2-ThioU-ATCase

Puisque les enzymes allostériques manifestent une très grande spécificité vis-à-vis des rétroinhibiteurs comme vis-à-vis des substrats, il était très improbable que le CTP rétroinhibe la 2-ThioU-ATCase et l'ATCase par des mécanismes différents. Toutefois, plusieurs caractéristiques de l'inhibition des deux enzymes par le CTP ont été comparées.

2.1.3.1 - Dépendance vis-à-vis du pH de l'inhibition par le CTP

La figure 12 montre que la dépendance vis-à-vis du pH de l'inhibition par le CTP est semblable pour les deux enzymes. La plus faible efficacité observée dans le cas de la 2-ThioU-ATCase a déjà été précédemment mentionnée. Dans le cas des deux enzymes la sensibilité au CTP augmente lentement de pH 7 à pH 10, et diminue rapidement vers les pH acides. Cette forte diminution de la sensibilité aux pH acides suggère qu'un (ou plusieurs) acide (s) aminé (s) dont le pK est aux alentours de la neutralité serait impliqué dans la fixation du CTP ou dans le mécanisme moléculaire lié à la rétroinhibition.

2.1.3.2 - Réversibilité par l'aspartate de la rétroinhibition

Les conditions de réversibilité par l'aspartate de la rétroinhibition ont été aussi comparativement étudiées sur les deux enzymes. Cette réversibilité a été bien établie à pH 7 dans le cas de l'ATCase normale / 54 /, tandis qu'il a été rapporté par WEITZMANN et WILSON / 55 / qu'à pH alcalin, la rétroinhibition par le CTP ne pouvait être réversée par l'aspartate.

L'influence de l'aspartate sur la rétroinhibition par le CTP a été étudiée sur l'ATCase normale et la 2-ThioU-ATCase. Les résultats présentés Tableau III montrent que l'aspartate ne réverse pas l'inhibition de l'enzyme normale par le CTP à pH 9,

FIGURE 12

Dépendance vis-à-vis du pH de l'inhibition par le CTP.

L'inhibition par le CTP 5 mM de l'ATCase (0,4 µg) et de la 2-ThioU-ATCase (0,6 µg) a été déterminée dans les conditions décrites dans "Méthodes" à différents pH.

Les tampons cacodylate 50 mM pour les pH 6 à 7,5 (- o - o -) et (- □ - □ -) et 2-amino-2-méthyl-1,3 propandiol-HCl 50 mM pour les pH 7,5 à 9,5 (- ● - ● -) et (- ■ - ■ -) ont été utilisés.

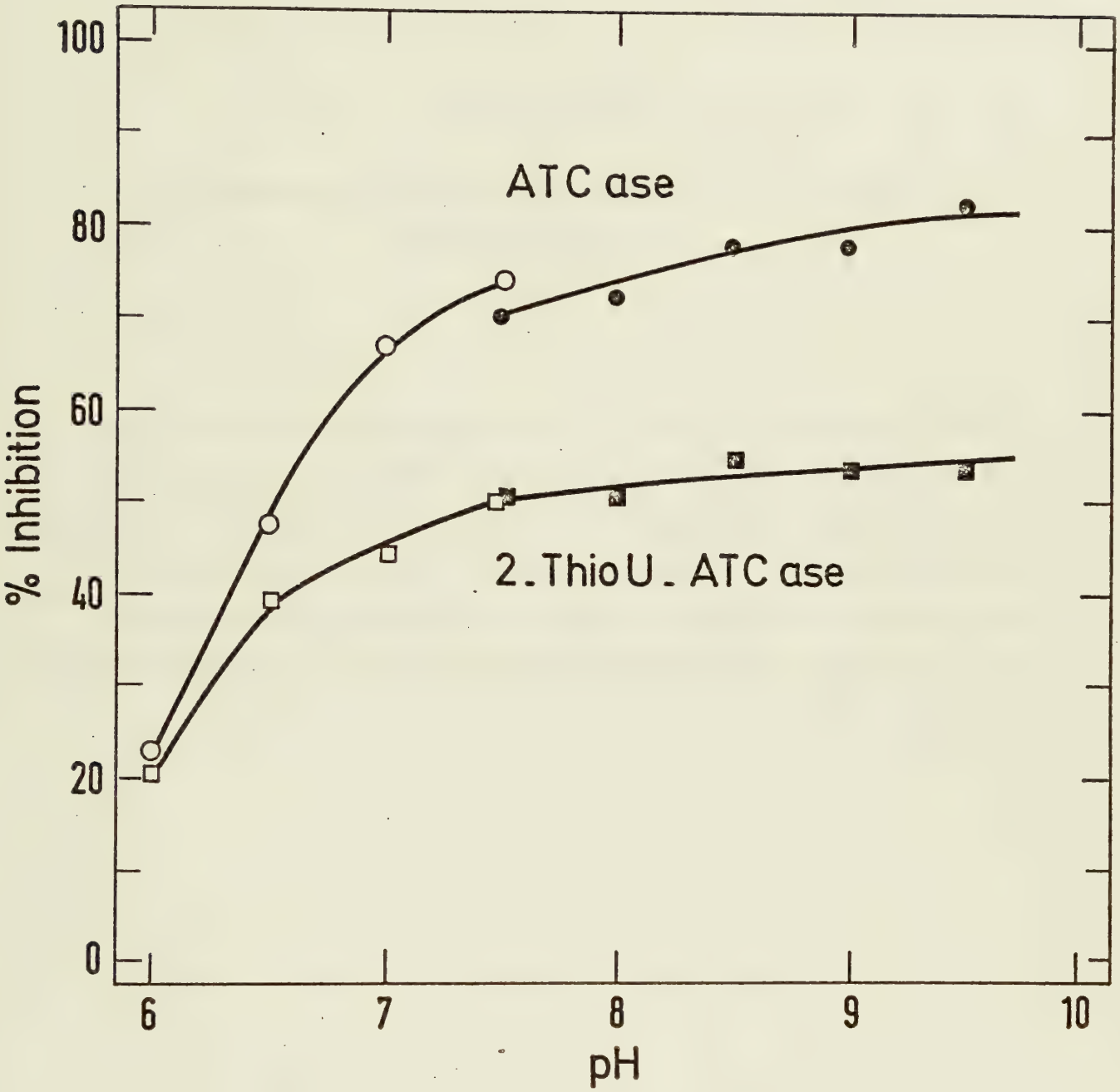

100
80
60
40
20
0
% Inhibition
ATC ase
2-Thio U - ATC ase
6
7
8
9
10
pH

TABLEAU III

Influence de la concentration en aspartate sur la rétroinhibition par le CTP à différents pH

Les taux d'inhibition de l'ATCase et de la 2-ThioU-ATCase par le CTP 5 mM ont été déterminés dans les conditions décrites dans "Méthodes", soit en présence de tampon cacodylate 50 mM, pH 7, ou de tampon 2-amino-2 méthyl-1,3 propandiol-HCl 50 mM, pH 9. 0,4 μg d'ATCase ou 0,6 μg de 2-ThioU-ATCase ont été utilisés quand les incubations ont été faites en présence d'aspartate 5 mM et 0,3 μg de l'un ou l'autre enzyme quand les incubations ont été faites en présence d'aspartate 10 mM.

TABLEAU III

Influence de la concentration en aspartate sur la rétroinhibition par le CTP à différents pH

	pH 7		pH 9	
Concentration en aspartate	5 mM	10 mM	5 mM	10 mM
Inhibition de l'ATCase	67 %	43 %	77 %	84 %
Inhibition de la 2-ThioU-ATCase	44 %	25 %	53 %	57 %

ainsi que l'avaient observé WEITZMANN et WILSON, tandis qu'une réversion de l'inhibition se manifeste à pH 7. Vis-à-vis de ces propriétés la 2-ThioU-ATCase se comporte exactement comme l'ATCase.

2.1.3.3 - Changement conformationnel provoqué par la fixation du CTP

Le spectre de dichroïsme circulaire des protéines entre les longueurs d'onde 250 et 310 nm résulte de l'assymétrie intrinsèque ou acquise des résidus phénylalanine, tyrosine et tryptophane. Un changement dans cette assymétrie provoque une modification du spectre.

Les spectres de dichroïsme circulaire des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée en absence et en présence de CTP 0,12 mM ont été enregistrés et, dans le cas de chaque enzyme respectivement, la différence entre ces spectres a été calculée. Comme le montre la figure 13, ces spectres sont qualitativement analogues et croisent tous deux la ligne de base à 255 nm. Ce résultat indique que le CTP induit les mêmes perturbations conformationnelles dans les deux enzymes, bien que la valeur maximale de $\Delta [\Theta]$ aux environs de 275 nm soit réduite de 30 % dans le cas de la 2-ThioU-ATCase. Cette diminution d'amplitude doit être le reflet de la diminution de la sensibilité au CTP de la 2-ThioU-ATCase précédemment mentionnée.

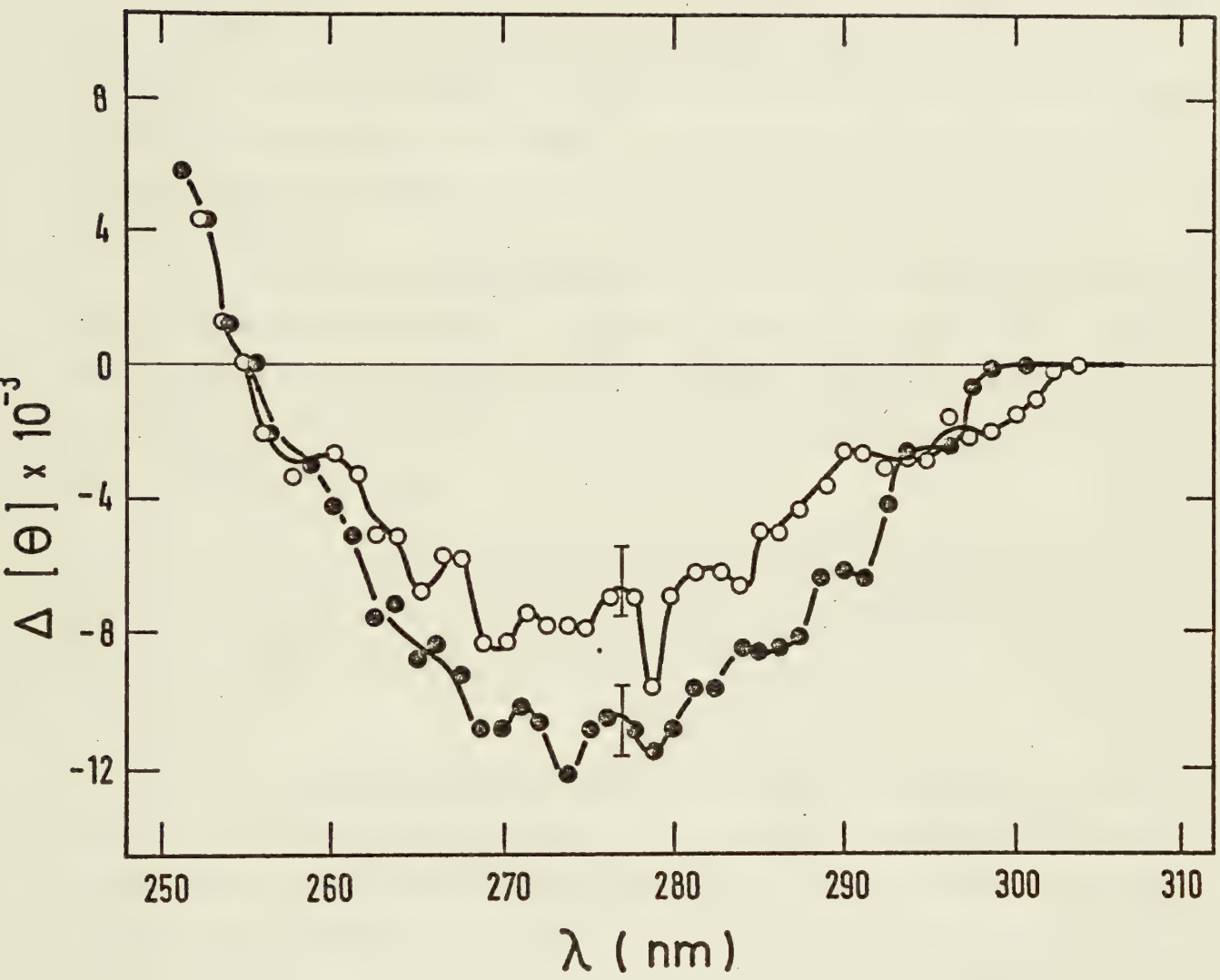
Le spectre de différence de dichroïsme circulaire obtenu au cours de la liaison du CTP à l'ATCase, molécule qui manifeste les interactions hétérotropes sous l'influence de cet effecteur, est qualitativement différent de celui qui est observé lorsque le CTP se lie aux sous-unités régulatrices isolées / 43 , 44 /. Ce résultat indique qu'il existe dans l'enzyme natif comparé aux sous-unités régulatrices isolées des perturbations supplémentaires dans l'environnement de résidus tyrosyls consécutivement à la liaison du CTP. Il est intéressant de constater l'existence de ces mêmes perturbations caractéristiques de l'enzyme natif lorsque le CTP se lie à la 2-ThioU-ATCase.

FIGURE 13

Spectres de dichroïsme circulaire différentiel dus à la liaison du CTP aux ATCases normale et 2-ThioU-modifiée.

Les spectres de dichroïsme circulaire différentiel ont été calculés à partir des spectres enregistrés dans les conditions décrites dans "Méthodes", dans un tampon imidazole-acétate 0,04 M, pH 7,0, contenant du β-mercapto éthanol 2 mM et de l'EDTA 0,2 mM. Les molarités finales étaient de 0,12 mM en CTP et de $1,8 \times 10^{-5}$ M en protomères RC pour chaque enzyme, dont la concentration a été évaluée par l'absorption en ultra-violet. Les différences d'éllipticités molaires $\Delta [\Theta]$, sont exprimées en degrés.cm^2 par d.mole de protomère RC.

(- ● - ● -) ATCase ; (- o - o -) 2-ThioU-ATCase.


8
4
0
-4
-8
-12
Δ [θ] x 10^-3
250
260
270
280
290
300
310
λ (nm)

2.1.3.4 - La 2-ThioU-ATCase présente plusieurs classes de sites d'affinités différentes pour la fixation du CTP

Il existe au niveau des sous-unités régulatrices de l'ATCase deux classes de sites d'affinités différentes pour la fixation du rétroinhibiteur CTP / 65 , 66 , 67 , 68 , 69 /. Selon certains auteurs, bien que les résultats soient moins clairs, il en serait de même pour la fixation de l'activateur ATP, dont les constantes d'association à l'enzyme dont plus faibles que celles du CTP / 68 , 69 /.

Bien qu'il ne soit pas absolument exclu que ces sites d'affinités différentes ne préexistent dans la molécule, il est probable qu'au sein du dimère de sous-unités régulatrices se produise un phénomène de coopérativité négative pour la liaison du rétroinhibiteur. Plusieurs auteurs ont ainsi interprété leurs résultats concernant l'ATCase native / 67 , 68 bis , 69 bis /.

Cette hypothèse s'appuie en outre sur le fait que les études de liaison du CTP aux dimères de chaînes régulatrices isolés ont montré l'existence possible de deux types de sites d'affinités différentes pour le CTP / 70 /.

Les sous-unités régulatrices dans la 2-ThioU-ATCase sont donc capables de lier le CTP puisque le rôle régulateur de ce métabolite se manifeste par l'intermédiaire des interactions hétérotropes (paragraphe 2.1.1). Il était intéressant d'examiner si la perte des interactions responsables des effets homotropes entre sites catalytiques a une conséquence au niveau des sites régulateurs : d'une part, sur l'existence de plusieurs classes de sites pour la fixation du nucléotide, d'autre part, sur la valeur des constantes d'association du nucléotide à l'enzyme.

Dans ce but, l'étude des interactions entre le CTP et la 2-ThioU-ATCase a été réalisée par dialyse à l'équilibre selon MYER et SCHELLMAN / 47 / dans les conditions décrites dans "Méthodes".

Sur la figure 14 sont représentés, selon SCATCHARD / 48 /, les résultats obtenus au cours de l'étude des interactions entre 2-ThioU-ATCase et CTP, d'une

FIGURE 14

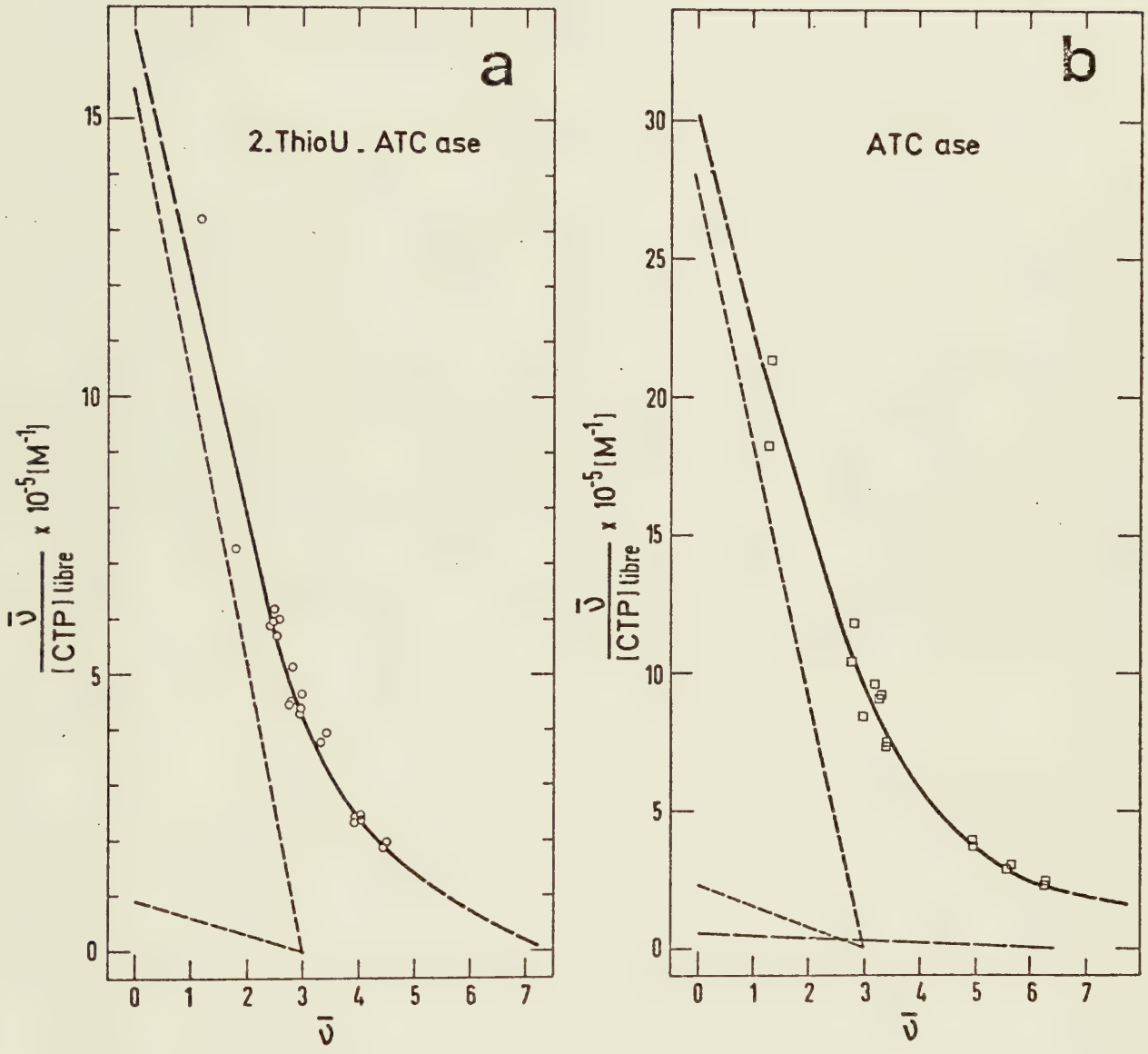
Représentations selon Scatchard relatives à la fixation du CTP aux ATCases normale et 2-ThioU-modifiée.

Les concentrations en ligand lié et libre ont été évaluées après dialyses à l'équilibre de la manière décrite dans "Méthodes".

Les concentrations en ATCases normale et 2-ThioU-modifiée étaient de $2,6 \times 10^{-6}$ M lorsque les concentrations initiales en CTP variaient de 5×10^{-6} M à $1,5 \times 10^{-5}$ M, pour l'étude des sites de fortes affinités, et de $7,3 \times 10^{-6}$ M lorsque les concentrations en CTP variaient de $2,5 \times 10^{-5}$ M à 2×10^{-4} M. Chaque équilibre a été réalisé en triple.

Les courbes expérimentales peuvent être décomposées en plusieurs droites dont chacune représente une classe de sites.

a) 2-ThioU-ATCase ; b) ATCase.


a
2.ThioU . ATC ase
$\frac{\bar{\nu}}{[CTP]\,libre} \times 10^{-5}[M^{-1}]$
$\bar{\nu}$
b
ATC ase
$\frac{\bar{\nu}}{[CTP]\,libre} \times 10^{-5}[M^{-1}]$
$\bar{\nu}$

part (figure 14 a), et entre ATCase et CTP, d'autre part (figure 14b). Dans le cas de la 2-ThioU-ATCase, comme dans le cas de l'ATCase, les points ne peuvent être liés par une droite, ce qui indique l'existence de plusieurs classes de sites pour la liaison du CTP. Les valeurs de " $\overline{\nu}$ " et des concentrations en "CTP libre" correspondant à chaque équilibre ont servi de données pour le calcul par une méthode de régression linéaire itérative du nombre de sites de chaque classe et de leurs affinités.

Les points expérimentaux obtenus dans le cas de la 2-ThioU-ATCase comme dans le cas de l'ATCase sont liés par une courbe qui coïncide avec une courbe théorique résultante de la combinaison de trois droites. Ces trois droites correspondent à l'existence de trois classes de sites : deux classes de trois sites de forte affinité, et une troisième classe de six sites de plus faible affinité. Cette dernière classe de sites doit correspondre à une faible liaison du CTP aux six sites catalytiques. PORTER, MODEBE et STARK / 35 / avaient montré, en effet, que comme la plupart des molécules portant un groupement phosphate, le CTP se lie au site de liaison du carbamyl-phosphate des sous-unités catalytiques, bien que beaucoup plus faiblement qu'aux sites régulateurs de l'ATCase native. D'autre part, HAMMES, PORTER et WU / 71 / avaient observé que la présence de carbamyl-phosphate diminuait de 10-12 à 6 le nombre de sites de liaison du CTP par molécule d'enzyme.

Les valeurs des constantes d'association sont indiquées sur le Tableau IV. La première classe de sites dans la 2-ThioU-ATCase présente pour la fixation du CTP une affinité plus de dix fois supérieure à celle de la seconde classe de sites, comme dans le cas de l'ATCase, bien que les constantes correspondant à la même catégorie de sites ont, dans le cas de l'enzyme modifié, des valeurs inférieures à celles obtenues dans le cas de l'ATCase. Ce phénomène peut être dû à une modification des sous-unités régulatrices au niveau des sites de liaison de l'effecteur, ou d'une erreur dans l'évaluation du nombre de sites (bien que la meilleure correspondance des points expérimentaux avec l'existence des trois catégories de sites précédemment indiquées ait été bien établie).

TABLEAU IV

Constantes d'association du C T P aux ATCases normale et 2-ThioU-modifiée

Les valeurs expérimentales de $\bar{v}$ et des concentrations en "ligand libre" qui correspondent à chaque équilibre ont servi de données pour la détermination des constantes d'association par une méthode de régression linéaire itérative. Dans le cas de la 2-ThioU-ATCase, comme dans celui de l'ATCase les meilleures régressions ont été obtenues pour trois classes de sites comportant respectivement 3,3 et 6 sites équivalents.

TABLEAU IV

Constantes d'association du C T P aux ATCases normale et 2-ThioU-modifiée

	N° classe de site	Nombre de sites	Constantes d'association (M^{-1})
2-ThioU-ATCase	1	3	$5,2 \pm 0,6 \times 10^5$
	2	3	$2,9 \pm 1,3 \times 10^4$
	3	6	Faible association
ATCase	1	3	$9,2 \pm 1,6 \times 10^5$
	2	3	$7,5 \pm 2,1 \times 10^4$
	3	6	$1,1 \pm 0,2 \times 10^4$

2.1.4 - Le CTP agit au niveau du K_m apparent de la 2-ThioU-ATCase pour l'aspartate

L'ATCase est considérée comme un enzyme allostérique de type K, c'est-à-dire que ses différentes conformations différeraient par leurs K_m apparents pour le substrat. Cette affirmation est basée sur l'observation que les effecteurs CTP et ATP affectent la sigmoïdicité de la courbe qui exprime la relation entre vitesses initiales et concentrations en aspartate, mais ne semblent pas affecter la vitesse maximum /2 /.

Puisque la 2-ThioU-ATCase ne manifeste pas d'interactions coopératives et montre une cinétique de types MICHAËLIS-MENTEN, la représentation graphique des vitesses initiales en fonction des concentrations en aspartate est linéaire et conduit à une détermination graphique du K_m apparent pour l'aspartate et de la vitesse maximum.

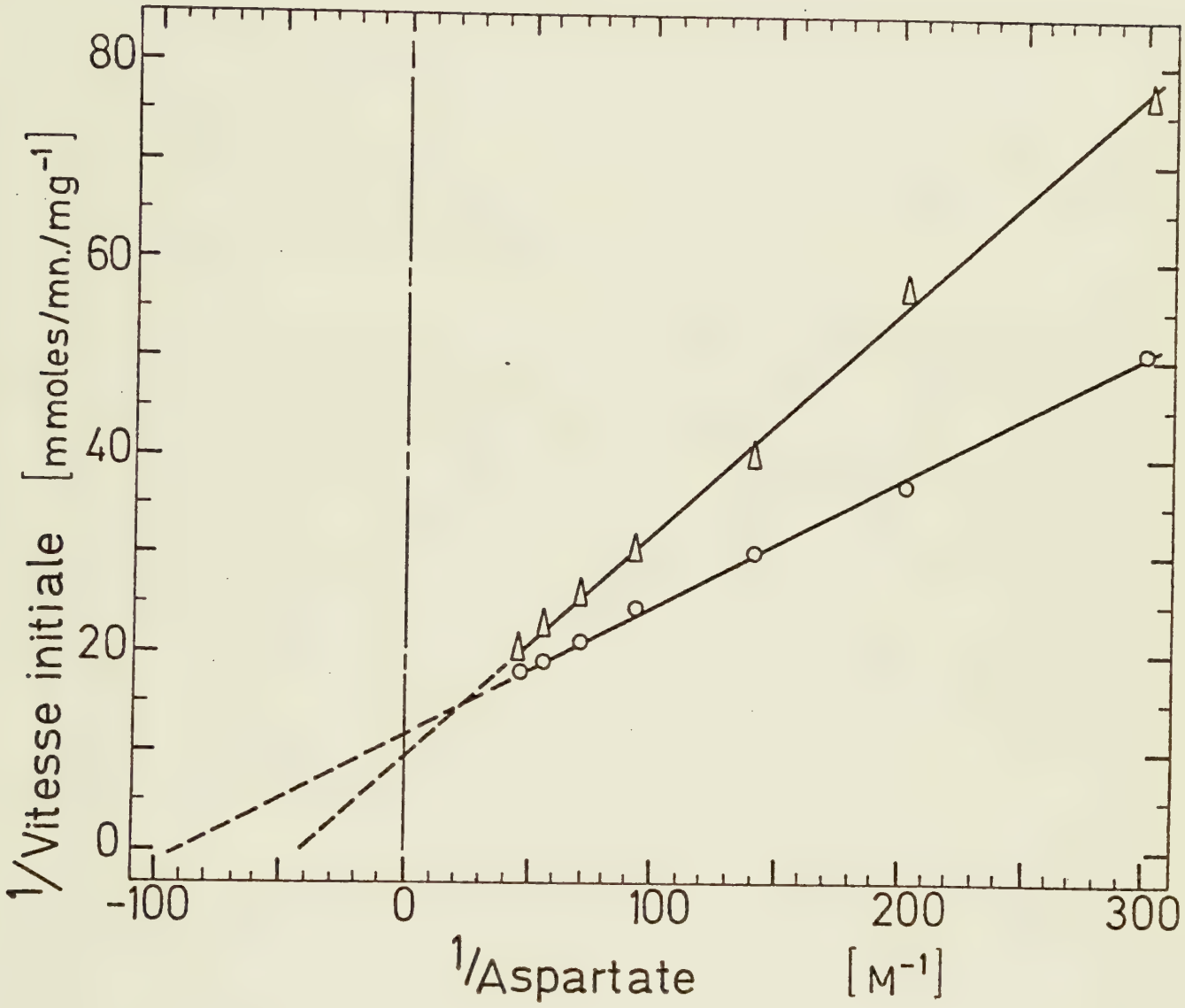
Le fait que les interactions coopératives ne réapparaissent pas même en présence d'une forte concentration en CTP, permet de déterminer directement si le CTP modifie la vitesse maximum où le K_m apparent de l'enzyme modifié pour l'aspartate. La figure 15 montre selon la représentation réciproque de LINEWEAVER-BURK les activités de la 2-ThioU-ATCase en absence et en présence de CTP 0,5 mM. A cette concentration, le CTP inhibe l'enzyme de 32 % en présence de 5 mM en aspartate. On peut observer un effet sensible dû à la présence du CTP sur le K_m apparent pour l'aspartate qui augmente de $1,44 \pm 0,16 \times 10^{-2}$ M à $2,88 \pm 0,32 \times 10^{-2}$ M en présence du rétroinhibiteur, les valeurs de V_{max} étant respectivement de $6,06 \pm 0,48$ mmoles/h/mg et de $7,46 \pm 0,66$ mmoles/h/mg en absence et en présence de CTP. Il apparaît donc que le CTP agit essentiellement en modifiant le K_m apparent pour l'aspartate.

FIGURE 15

Effet du CTP sur le K_m apparent de la 2-ThioU-ATCase pour l'aspartate.

La 2-ThioU-ATCase (0,5 µ g) a été incubée dans les conditions décrites dans "Méthodes" pour l'inhibition par le CTP, en présence de concentrations croissantes d'aspartate et en absence ou en présence de CTP 0,5 mM. Le tampon cacodylate de sodium 50 mM, pH 7, a été utilisé. Les résultats sont présentés selon la représentation inverse de LINEWEAVER-BURK.

(- o - o -) Contrôle sans CTP ; (- Δ - Δ -) En présence de CTP 0,5 mM.


80
60
40
20
0
-100
0
100
200
300
1/Vitesse initiale [mmoles/mn./mg⁻¹]
1/Aspartate [M⁻¹]

2.2 - L'Activité de la 2-ThioU-ATCase est Stimulée par l'ATP

Le fait que dans la 2-ThioU-ATCase les interactions homotropes coopératives ne réapparaissaient pas en présence de fortes concentrations de rétroinhibiteur CTP, indique que le changement de conformation qui résulte de l'action de cet effecteur doit être distinct du changement conformationnel impliqué dans les interactions coopératives entre sites catalytiques. On pouvait se demander s'il en est de même pour l'action de l'ATP, qui est stimulateur de l'ATCase, et si, par conséquent, ce nucléotide est susceptible de stimuler l'activité de la 2-ThioU-ATCase.

L'effet de l'ATP 10^{-3} M sur l'activité de la 2-ThioU-ATCase a été étudié dans les conditions décrites dans "Méthodes", en présence de concentrations croissantes en aspartate. Les résultats, présentés Tableau V, montrent que l'ATP stimule l'activité de la 2-ThioU-ATCase au même titre que celle de l'ATCase. Les activités des sous-unités catalytiques isolées sont légèrement inhibées, ce qui doit correspondre à une inhibition compétitive peu spécifique au niveau du site de fixation du carbamyl phosphate, ce qui a été également observé dans le cas du CTP / 35 , 55 /. On constate que l'efficacité de l'activation par l'ATP est plus faible vis-à-vis de l'enzyme modifié que vis-à-vis de l'enzyme normal , de même que le CTP inhibait moins efficacement la 2-ThioU-ATCase que l'ATCase.

La représentation graphique selon LINEWEAVER-BURK des inverses des vitesses initiales en fonction des inverses des molarités en aspartate, en présence et en absence d'ATP 10^{-3} M est présentée figure 16. Il peut être constaté que l'ATP diminue le K_m apparent de la 2-ThioU-ATCase pour l'aspartate, qui passe de $14,4 \pm 1,6 \times 10^{-3}$ M à $7,4 \pm 10^{-3}$ M. Une diminution de la vitesse maximum est également observée.

TABLEAU V

Activation de la 2-ThioU-ATCase par l'ATP

L'ATcase (0,4 μg), la 2-ThioU-ATCase (0,8 μg) ou les sous-unités catalytiques (0,24 μg) ont été incubées dans les conditions décrites dans "Méthodes" pour l'étude de l'activation par l'ATP en présence de quantités croissantes d'aspartate aux molarités indiquées. Les pourcentages d'activation ont été déterminées en présence d'ATP 10^{-3} M.

TABLEAU V

Activation de la 2-ThioU-ATCase par l'ATP

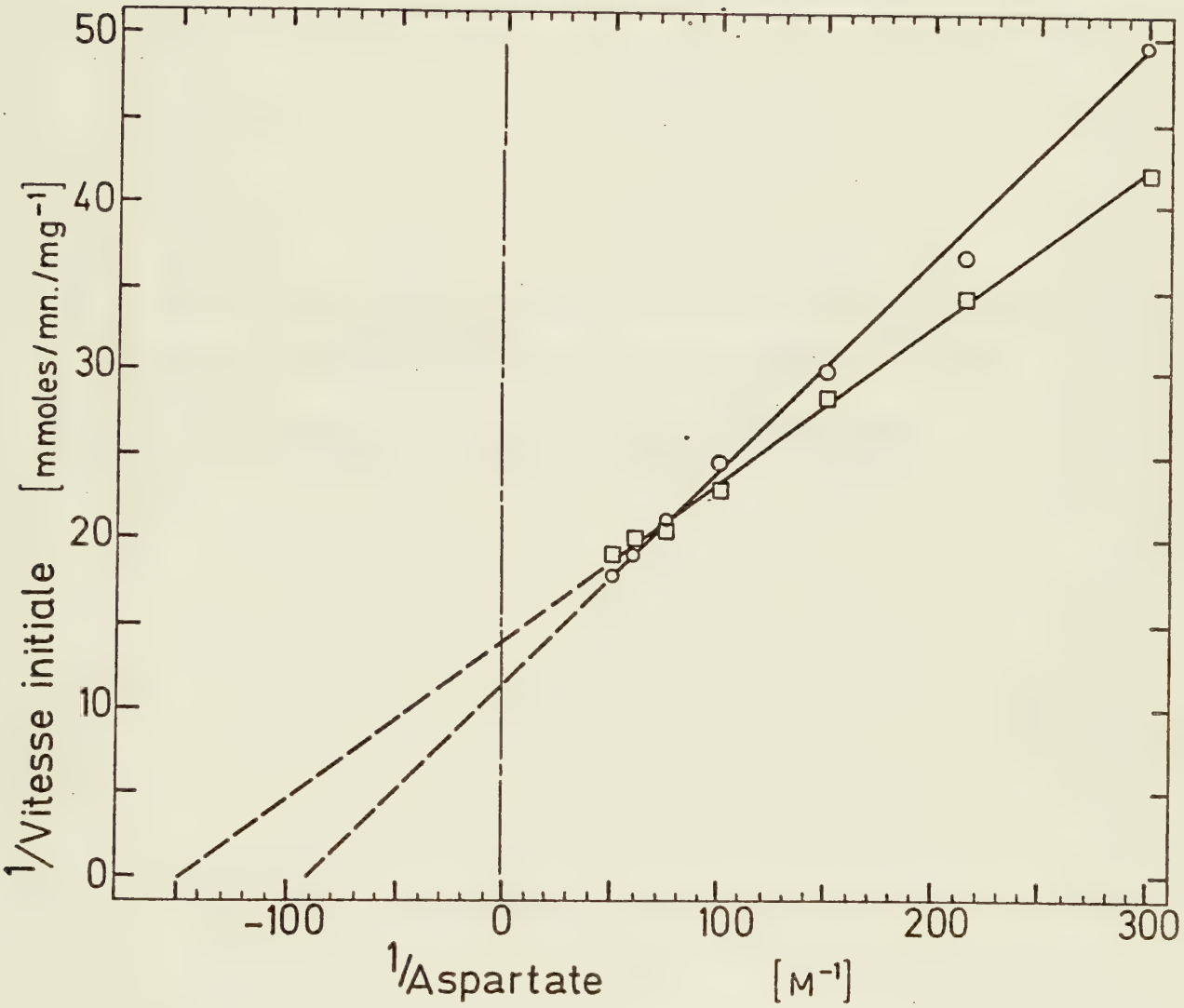
Enzyme	Concentration en aspartate	Effet de l'ATP 10^{-3} M
AT Case	$3,3 \times 10^{-3}$ M	+ 68 %
	$6,6 \times 10^{-3}$ M	+ 17 %
2-ThioU-ATCase	$3,3 \times 10^{-3}$ M	+ 30 %
	$6,6 \times 10^{-3}$ M	+ 13 %
Sous-unités catalytiques	5×10^{-3} M	- 12 %

FIGURE 16

Effet de l'ATP sur l'activité de la 2-ThioU-ATCase.

La 2-ThioU-ATCase (0,5 µg) a été incubée dans les conditions décrites dans "Méthodes" pour l'étude de la stimulation par l'ATP, en présence de molarités croissantes d'aspartate avec ou sans ATP 10^{-3} M. Les résultats sont présentés selon la représentation de LINEWEAVER-BURK.

(- o - o -) Contrôle en absence d'ATP ; (- □ - □ -) En présence d'ATP 10^{-3} M.


50
40
30
20
10
0
-100
0
100
200
300
1/Vitesse initiale [mmoles/mn./mg⁻¹]
1/Aspartate [M⁻¹]

Ainsi l'ATP stimule l'activité des sites catalytiques dans la 2-ThioU-ATCase, bien que ces sites ne soient plus soumis aux interactions homotropes. Le fait que l'inhibiteur CTP et l'activateur ATP soient capables de moduler l'activité catalytique de cet enzyme indique que ces effecteurs doivent agir par un mécanisme distinct de celui qui est impliqué dans ces interactions.

3 - LES PROPRIETES DES SOUS-UNITES CATALYTIQUES ET CELLES DES SOUS-UNITES REGULATRICES SONT MODIFIEES DANS LA 2-THIOURACILE-ASPARTATE TRANSCARBAMYLASE

L'analyse comparée du comportement électrophorétique des sous-unités catalytiques et 2-ThioU-catalytiques a montré que ces dernières sont modifiées au moins en ce qui concerne leur charge ou (et ?) leur conformation (Chapitre I, paragraphe 1.1.5.2).

Puisque la 2-ThioU-ATCase contient les deux espèces distinctes de chaînes polypeptidiques en proportion normale (Chapitre I, paragraphe 1.1.4), l'altération des propriétés de l'enzyme ne peut résulter d'un défaut en quantité de l'une ou l'autre des espèces de chaînes dans l'oligomère. L'ensemble des propriétés particulières à la 2-ThioU-ATCase qui sont décrites dans les précédents chapitres pourrait donc résulter de modifications au seul niveau des sous-unités catalytiques, les sous-unités régulatrices pouvant être normales. Cependant l'hypothèse ne peut être exclue que chaque espèce de sous-unités soit modifiée et joue un rôle particulier dans l'altération des propriétés de l'enzyme.

Les propriétés structurales, catalytiques et régulatrices des sous-unités 2-ThioU-catalytiques et 2-ThioU-régulatrices isolées ou intégrées à la 2-ThioU-ATCase native ont donc été analysées comparativement à celles des sous-unités normales. Ces analyses, qui font l'objet du présent chapitre ont montré que chacune des deux espèces de sous-unités de la 2-ThioU-ATCase est modifiée, et contribue, par sa structure et ses propriétés, au comportement particulier de l'enzyme.

3.1 - Les Sous-Unités Catalytiques sont Responsables de l'Altération des Propriétés Spectroscopiques et de la Diminution de l'Activité Spécifique dans la 2-ThioU-ATCase.

Le rôle, précédemment démontré (Chapitre I, paragraphe 1.1.5.2) des seules sous-unités catalytiques dans la modification de la mobilité électrophorétique de la 2-ThioU-ATCase par rapport à l'ATCase démontre que la modification de ces sous-unités altère significativement les propriétés physiques de l'enzyme. Afin d'analyser plus profondément les conséquences qu'impliquent les propriétés physiques particulières des sous-unités 2-ThioU-catalytiques et 2-ThioU-régulatrices sur celles de la 2-ThioU-ATCase, les spectres d'absorption en ultra-violet et les spectres de dichroïsme circulaire de l'enzyme et de ses sous-unités ont été enregistrés. L'analyse de ces spectres, dont les résultats sont rapportés ci-dessous, et leur comparaison à ceux des espèces enzymatiques normales ont montré que par ses propriétés spectroscopiques la 2-ThioU-ATCase est différente de l'ATCase et que les sous-unités 2-ThioU-catalytiques sont, pour une large part, responsables de cette différence.

3.1.1 - Analyse des ATCases et sous-unités 2-ThioU-modifiées par les méthodes spectroscopiques

L'étude des conformations des ATCases et sous-unités 2-ThioU-modifiées a été réalisée à l'aide de deux méthodes qui sont : d'une part, la spectroscopie d'absorption en ultra-violet, qui dépend de la nature, du nombre et de l'environnement des acides aminés chromophores, et, d'autre part, la spectroscopie de dichroïsme circulaire qui, entre 250 et 310 nm reflète l'assymétrie intrinsèque ou acquise des résidus chromophores.

3.1.1.1 - Spectres d'absorption en ultra-violet de la 2-ThioU-ATCase et de ses sous-unités

Les spectres d'absorption de la 2-ThioU-ATCase et de ses sous-unités ont été enregistrés dans les conditions décrites dans "Méthodes", et comparés à ceux des espèces enzymatiques normales correspondantes. La figure 17 a montre que les deux enzymes natifs présentent un maximum d'absorption à 279 nm, mais que le coefficient d'absorption est supérieur dans le cas de la 2-ThioU-ATCase. Afin de déterminer si cette différence est due spécifiquement à un type de sous-unités, les spectres d'absorption des sous-unités 2-ThioU-catalytiques et 2-ThioU-régulatrices ont été enregistrés et comparés à ceux des sous-unités normales. Le spectre d'absorption des sous-unités 2-ThioU-régulatrices est, comme le montre la figure 17 b, identique à celui des sous-unités régulatrices pour les longueurs d'onde supérieures à 270 nm. Au-dessous de cette longueur d'onde, la légère différence entre les spectres fait penser à celle observée lorsque les spectres des sous-unités "apo-régulatrices" et zinc-régulatrices sont comparées / 13 /. Cependant, comme le montre l'analyse détaillée dans le Chapitre 5 (paragraphe 5.4), la 2-ThioU-ATCase n'est pas un enzyme déficient en zinc.

Il apparaît ainsi que les sous-unités 2-ThioU-régulatrices ne sont pas responsables du coefficient d'extinction supérieur de la 2-ThioU-ATCase par rapport à celui de l'ATCase. Par contre, les spectres d'absorption des sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU-modifiées sont très différents, comme le montre la figure 17 c. Les coefficients d'extinction aux longueurs d'onde d'adsorptions maxima de ces différentes espèces moléculaires sont présentés Tableau VI. Les comparaisons de ces valeurs et des spectres des figures 17 a et 17 c permettent de constater que quelle que soit la longueur d'onde considérée, les coefficients d'extinction des sous-unités 2-ThioU-catalytiques ne peuvent toutefois entièrement rendre compte de la différence d'absorption observée entre l'ATCase et la 2-ThioU-ATCase.

Au cours de la biosynthèse de la 2-ThioU-ATCase, le 2-thiouracile ou un métabolite dérivé de celui-ci pourrait modifier chimiquement l'enzyme. Le 2-thiouracile pourrait aussi, en s'incorporant aux ARNs, provoquer au cours de la traduction

FIGURE 17

Spectres d'absorption en ultra-violet des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités.

Les spectres d'absorption ont été enregistrés dans les conditions décrites dans "Méthode Les coefficients d'extinction sont exprimés pour les solutions molaires de chaînes catalytiques, de chaînes régulatrices et de la somme des deux chaînes, les poids moléculaires de ces différentes espèces sont respectivement de 33 000, 17 000 et 50 000 daltons.

Les concentrations en protéines ont été déterminées d'après les valeurs des coefficients d'extinction molaire indiqués Tableau VI.

a) ATCase, 2-ThioU-ATCase et la différence calculée entre les spectres.
b) Spectres des sous-unités régulatrices normales et 2-ThioU-modifiées.
c) Spectres des sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU-modifiées et la différence calculée entre les spectres.

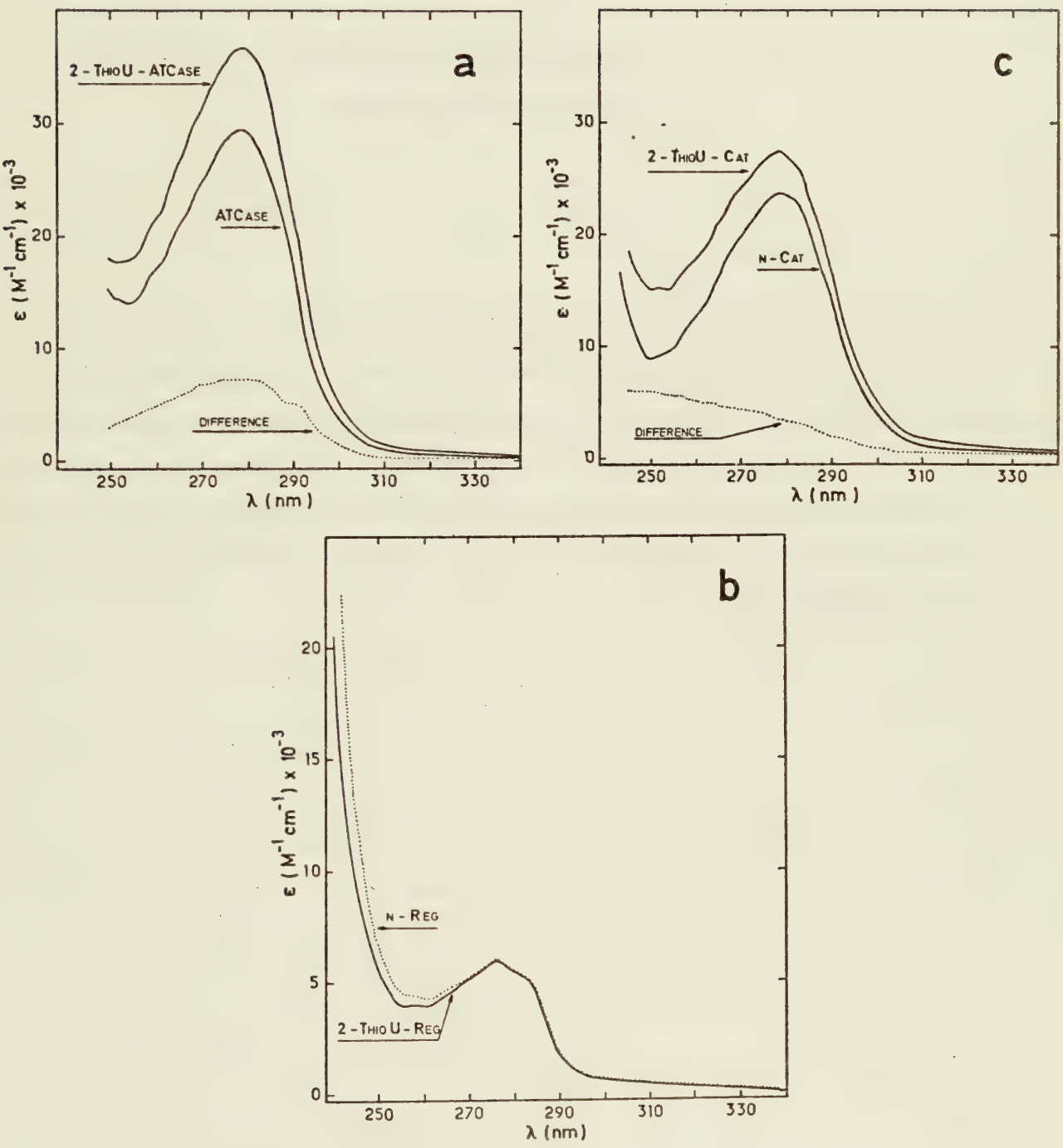

a
2 - ThioU - ATCase
ATCase
DIFFERENCE
ε (M⁻¹cm⁻¹) x 10⁻³
λ (nm)
c
2 - ThioU - Cat
N - Cat
DIFFERENCE
ε (M⁻¹cm⁻¹) x 10⁻³
λ (nm)
b
N - Reg
2 - Thio U - Reg
ε (M⁻¹cm⁻¹) x 10⁻³
λ (nm)

TABLEAU VI

Coefficients d'extinction des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités

Les coefficients d'extinction ont été déterminés de la manière décrite dans "Méthodes" aux longueurs d'onde d'absorptions maxima (279 nm pour les enzymes natifs et les sous-unités catalytiques et 276 nm pour les sous-unités régulatrices). Les moyennes et déviations standards ont été calculées à partir de 7 à 8 déterminations sur deux préparations enzymatiques dans le cas des enzymes natifs et des sous-unités catalytiques, et de 4 à 6 déterminations sur deux préparations différentes dans le cas des sous-unités régulatrices.

TABLEAU VI

Coefficients d'extinction des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités

	Coefficients d'extinction $(mg/ml)^{-1}$, cm^{-1}
ATCase	0,59 ± 0,01
2-ThioU-ATCase	0,73 ± 0,01
Sous-unités catalytiques	0,73 ± 0,01
Sous-unités 2-ThioU-catalytiques	0,85 ± 0,02
Sous-unités régulatrices	0,37 ± 0,02
Sous-unités 2-ThioU-régulatrices	0,38 ± 0,02

des erreurs de lecture du code génétique et modifier ainsi la structure primaire des chaînes protéiques. Dans ce cas la valeur supérieure à la normale du coefficient d'extinction de la 2-ThioU-ATCase s'expliquerait par un contenu plus grand en acides aminés aromatiques. Afin d'étudier cette hypothèse, des méthodes chimiques et spectroscopiques ont été utilisées pour déterminer les quantités de phénylalanine, tyrosine et tryptophane présents dans la 2-ThioU-ATCase.

Sur le Tableau VII sont présentés les résultats des analyses du contenu en acides aminés chromophores réalisées après hydrolyse acide dans les conditions standards des enzymes et des deux espèces de sous-unités normaux et 2-ThioU-modifiés. Les enzymes natifs ont en outre été hydrolysés dans les conditions protectrices du tryptophane, acide aminé qui est uniquement représenté dans les chaînes catalytiques de l'ATCase / 4 /. De plus, le contenu en tryptophane a été spécifiquement déterminé par titration par la N-bromosuccinimide. Aucune différence significative n'a pu être détectée dans le contenu en amino acides aromatiques, ni entre la 2-ThioU-ATCase et l'ATCase, ni entre leurs sous-unités.

Le contenu des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée en tyrosines et tryptophanes a été de plus calculé, selon la méthode de BENCZE et SCHMID / 52 /, à partir des spectres des protéines dénaturées dans NaOH 1 N. Dans ces conditions, comme le montre la figure 18, il existe entre les coefficients d'extinction, à la longueur d'onde d'absorption maximum, une différence analogue à celle qui existe entre les enzymes natifs non dénaturés (Tableau VI). Le contenu des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée en tyrosines et tryptophanes calculé à partir de ces spectres est indiqué Tableau VIII. Le nombre de résidus tyrosines, qui est du même ordre pour les deux enzymes, est, dans les limites de sensibilité des méthodes, en accord avec celui évalué par hydrolyse acide (Tableau VII). Par contre, le contenu en tryptophanes de la 2-ThioU-ATCase déterminé par cette méthode spectroscopique est de 50 % supérieur à celui de l'ATCase. Ainsi, puisque la détermination directe du tryptophane indiquée Tableau VII montre que ce n'est pas le cas, il apparaît que les sous-unités catalytiques de la 2-ThioU-ATCase pourraient contenir un chromophore, qui ne serait pas le tryptophane, mais qui absorberait aux mêmes longueurs d'onde que cet amino-acide. Cette interprétation rend également compte de la différence d'absorption

TABLEAU VII

Contenu en phénylalanines, tyrosines et tryptophanes des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités

Les résultats sont exprimés en nombre de résidus par molécule d'ATCase normale ou 2-ThioU-modifiée, par trimère de chaînes catalytiques ou par dimère de chaînes régulatrices.

a) Le contenu en phénylalanines et en tyrosines a été déterminé après hydrolyse par HCl 6 N et analyse de la composition en amino-acides dans les conditions standards décrites dans "Méthodes". Les moyennes et déviations standards ont été calculées à partir de six déterminations.

b) Les analyses du contenu en tryptophanes ont été réalisées après hydrolyse, soit par HCl 6 N contenant de l'acide thioglycolique 2,5 %, soit par l'acide p-toluène sulfonique 3,4 N contenant du 3-(2-amino éthyl)-indole 0,2 % dans les conditions décrites dans "Méthodes". Les moyennes et déviation standards ont été calculées à partir de six déterminations.

c) Détermination spectrophotoscopique du contenu en tryptophanes après dénaturation des protéines dans l'urée 9 M, et oxydation par la N-bromosuccinimide dans les conditions décrites dans "Méthodes".

TABLEAU VII

Contenu en phénylalanines, tyrosines et tryptophanes des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités

	ATCase	2-ThioU-ATCase	S.U.Cat.	S.U. 2-ThioU-Cat.	S.U.Reg.	S.U. 2-ThioU-Reg.
Phényl-alanine a)	106±7	106±7	38±3	35±3	10±0,9	10±0,4
Tyrosine a)	63±2	67±7	23±1	23±3	6±1	6,6±0,7
Tryptophane b)	13,4±0,7	14,2±1,3				
c)	11,4	11,7				

FIGURE 18

Spectres d'absorption des ATCases normale et 2-ThioU-modifiées dans la soude 0,1 N.

Les spectres d'absorption ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 15 et ont été analysés selon BENCZE et SCHMID / 52 / pour la détermination du contenu en tyrosines et tryptophanes.

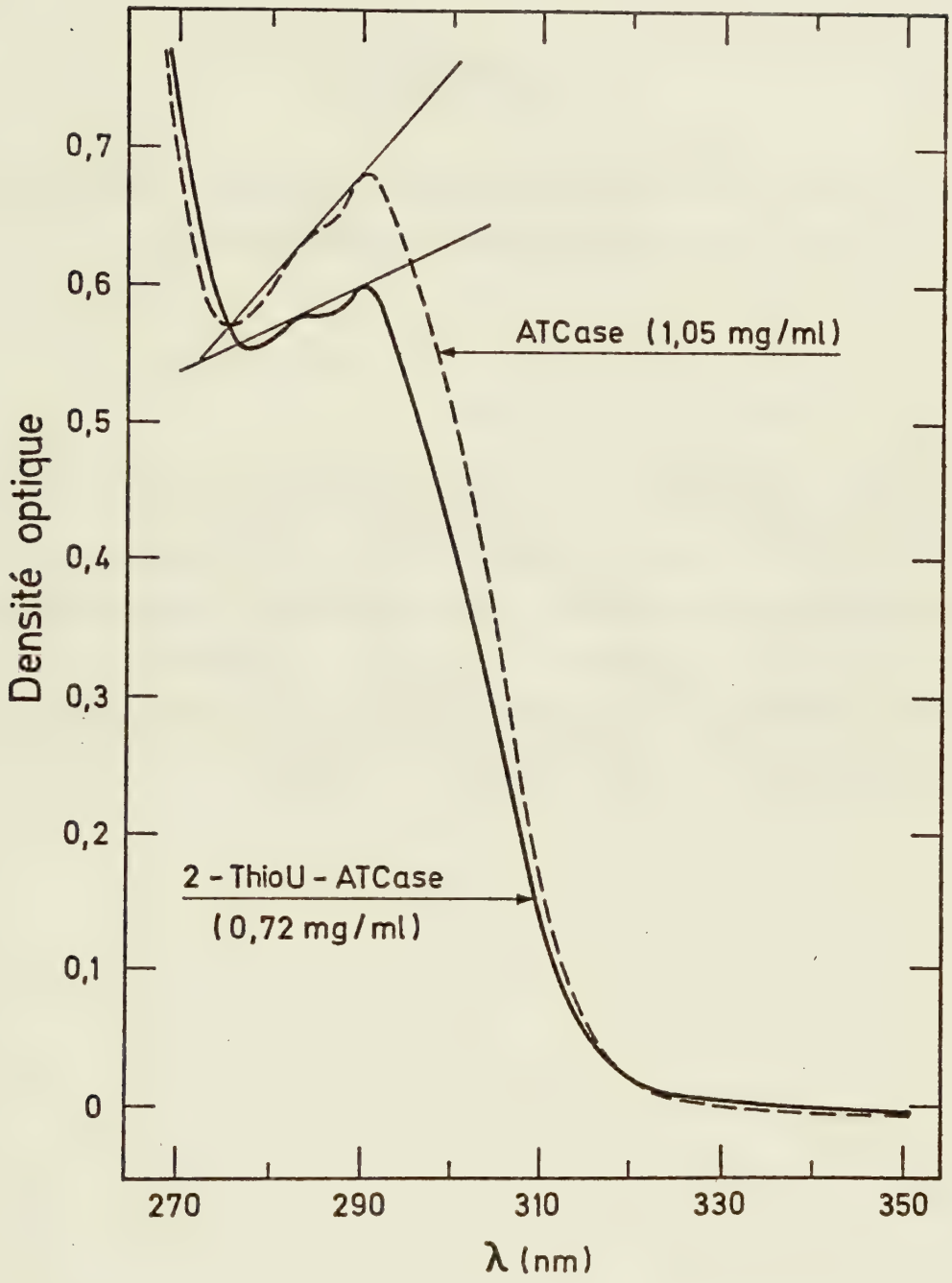

Densité optique
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
ATCase (1,05 mg/ml)
2 - ThioU - ATCase
(0,72 mg/ml)
270
290
310
330
350
λ (nm)

TABLEAU VIII

Contenu en tyrosines et tryptophanes déterminé à partir du spectre d'absorption des protéines dénaturées

Les spectres d'absorption en ultra-violet des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée dans NaOH 0,1 N ont été enregistrés. Dans le cas de chaque spectre, la pente de la tangente aux deux maximas a permi de déterminer, selon BENCZE et SCHMID / 52 /, le contenu en tyrosines et tryptophanes. Les résultats sont exprimés en nombre de résidus par molécule d'ATCase normale ou 2-ThioU-modifiée, et sont des moyennes réalisées à partir de six déterminations.

TABLEAU VIII

Contenu en tyrosines et tryptophanes déterminé à partir du spectre d'absorption des protéines dénaturées

	ATCase	2-ThioU-ATCase
Tyrosine	54,8 ± 5,6	58 ± 3,7
Tryptophane	15 ± 2	22 ± 3,6

observée, figure 17 a, entre les spectres de la 2-ThioU-ATCase et de l'ATCase. Il doit être cependant souligné que les méthodes utilisées ne pourraient permettre de déceler des modifications très discrètes dans le nombre des amino-acides chromophores. Cette dernière éventualité demeure néanmoins et doit être examinée à l'aide de nouvelles analyses.

3.1.1.2 - Spectres de dichroïsme circulaire de la 2-ThioU-ATCase et de ses sous-unités

Les spectres de dichroïsme circulaire entre 250 et 310 nm de la 2-ThioU-ATCase et de ses sous-unités ont été enregistrés dans les conditions décrites dans "Méthodes", et comparés aux spectres obtenus dans le cas des enzymes normaux. La figure 19 a montre le spectre dichroïque des sous-unités 2-ThioU-régulatrices. Ce spectre, qui croise la ligne de base à 245 et 267 nm, et présente un maximum à 252 nm et un minimum à 277 nm se superpose exactement à celui enregistré dans le cas des sous-unités régulatrices. Ces spectres sont la résultante d'un spectre dichroïque typique de résidus tyrosines entre 265 et 300 nm / 43 , 72 , 73 / et d'un spectre dû au chromophore zinc-mercaptide, responsable de l'intense pic positif à 252 nm / 10 , 43 , 44 /. Le spectre enregistré dans le cas des sous-unités 2-ThioU-catalytiques est, comme le montre la figure 19 b analogue, bien qu'un tiers moins intense, à celui des sous-unités catalytiques, et résulte de l'assymétrie autour de résidus tyrosine ($[\Theta]_{max}$ à 277 nm) et tryptophanes ($[\Theta]_{max}$ à 297 nm).

Sur la figure 19 c, les spectres de dichroïsme circulaire qui correspondent à la 2-ThioU-ATCase et à l'ATCase, sont comparés. Ces deux spectres présentent respectivement les maxima à 257,5 nm et 255,5 nm dus à la contribution du chromophore responsable, dans le cas des sous-unités régulatrices, de l'intense pic à 252 nm (figure 19 a). Il est remarquable que ces deux spectres ne soient pas identiques. En effet, dans le cas de l'ATCase, le pic maximum à 255,5 nm est non seulement plus intense que celui de la 2-ThioU-ATCase à 257,5 nm, mais aussi supérieur en intensité à la somme calculée des ellipticités à cette longueur d'onde des sous-unités catalytiques et régulatrices isolées. Ce phénomène a, par ailleurs, été observé par COHLBERG,

FIGURE 19

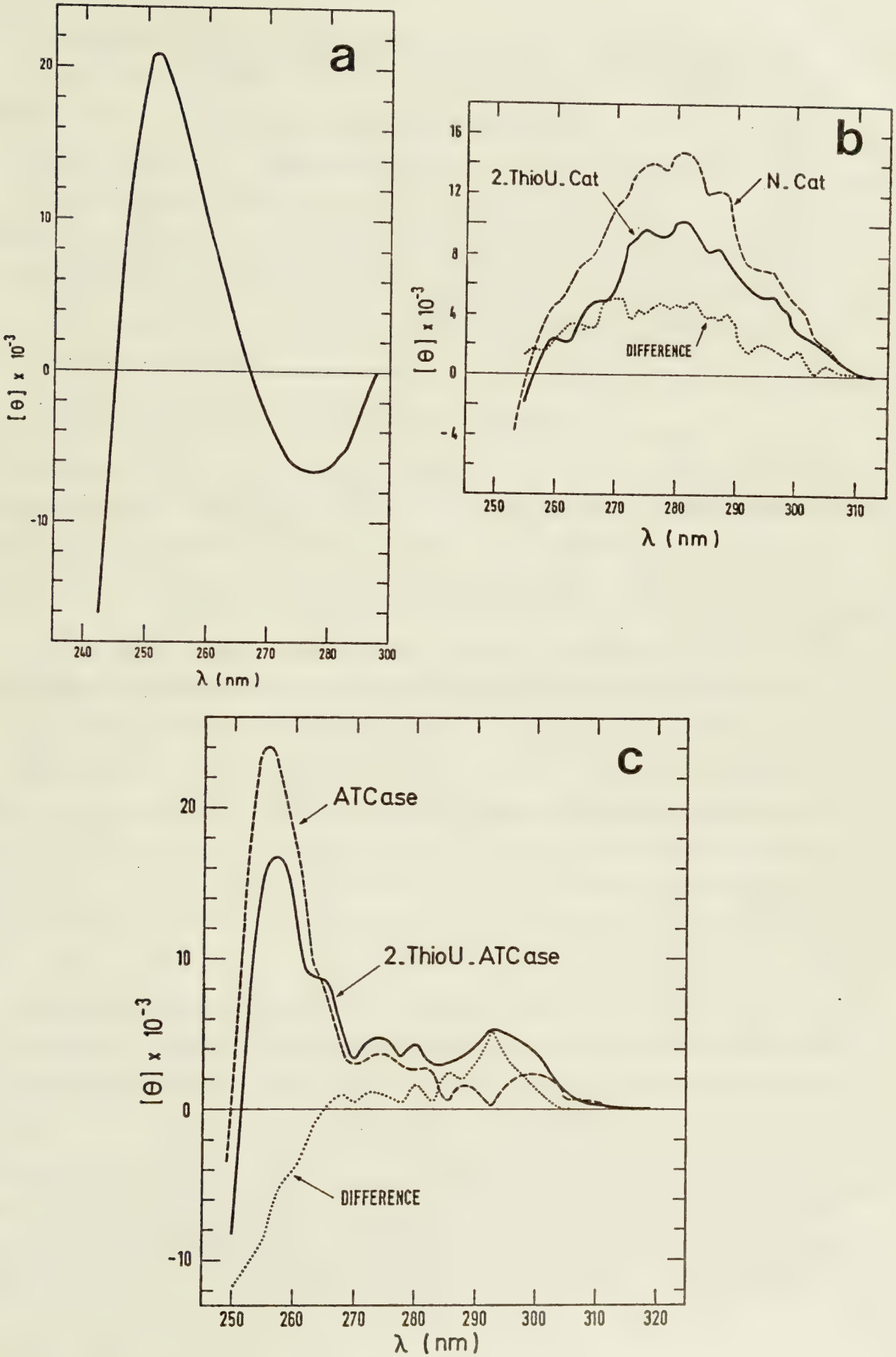
Spectres de dichroïsme circulaire des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités.

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés dans les conditions décrites dans "Méthodes". Les ellipticités molaires, $[\Theta]$, et les différences entre les ellipticités sont exprimées en unités de degrés.cm^2 par d.mole de protomère RC pour les enzymes natifs, ou de chaînes polypeptidiques R ou C pour les sous-unités isolées. Les concentrations en protéines ont été déterminées par spectrophotométrie d'absorption, en utilisant les coefficients d'extinction indiqués dans le Tableau VI.

a) Sous-unités régulatrices normales et 2-ThioU-modifiées (spectres identiques).

b) Sous-unités 2-ThioU-catalytiques (——), sous-unités catalytiques (– – –) et la différence calculée entre les spectres .

c) 2-ThioU-ATCase (——), ATCase (– – –) et la différence calculée entre les spectres.


a
20
10
0
-10
[θ] x 10^-3
240
250
260
270
280
300
λ (nm)
b
16
12
8
4
0
-4
[θ] x 10^-3
2.ThioU. Cat
N. Cat
DIFFERENCE
250
260
270
280
290
300
310
λ (nm)
c
ATCase
2.ThioU. ATCase
DIFFERENCE
20
10
0
-10
[θ] x 10^-3
250
260
270
280
290
300
310
320
λ (nm)

PIGIET et SCHACHMAN / 10 /. Le pic maximum, dans le cas du spectre de la 2-ThioU-ATCase est légèrement déplacé vers les plus grandes longueurs d'onde ($[\Theta]_{max}$ à 257,5 nm) et est d'intensité proche de celle de la somme des ellipticités à cette longueur d'onde des sous-unités catalytiques et régulatrices 2-ThioU-modifiées. Par contre, pour les longueurs d'onde supérieures à 264 nm l'intensité dichroïque du spectre de l'ATCase est, d'une part, inférieure à celle du spectre de la 2-ThioU-ATCase, et, d'autre part, inférieure à la somme des spectres des sous-unités catalytiques et régulatrices isolées.

Dans le cas de l'ATCase, il a été démontré / 10 /, que la reconstitution de l'ATCase à partir des sous-unités isolées augmente l'ellipticité de la somme des ellipticités des sous-unités à 255 nm, et la diminue aux longueurs d'onde supérieures à 265 nm. Ce résultat indique que les forces d'interaction entre sous-unités modifient la structure de celles-ci dans l'environnement des chromophores responsables du spectre dichroïque.

L'étude du spectre de dichroïsme circulaire de la 2-ThioU-ATCase confirme que la configuration des sous-unités est moins "affectée" par les interactions entre sous-unités que dans l'ATCase. Le spectre de la 2-ThioU-ATCase correspond en effet à la somme apparente des spectres particuliers aux deux espèces de sous-unités.

Les résultats obtenus au cours de l'étude des spectres d'absorption en ultra-violet et de dichroïsme circulaire ont souligné que, en raison de sa structure particulière, la 2-ThioU-ATCase présente des propriétés spectroscopiques différentes de l'ATCase. Bien qu'au niveau de l'enzyme natif, la contribution des sous-unités régulatrices aux propriétés spectroscopiques de la molécule soit inconnue, ces résultats ont montré que les sous-unités 2-ThioU-catalytiques ont des propriétés spectroscopiques largement affectées et qu'elles contribuent, sinon totalement, du moins pour une grande part aux particularités de la 2-ThioU-ATCase vis-à-vis de ces propriétés.

3.1.2 - Analyse des propriétés catalytiques de la 2-ThioU-ATCase

L'activité de la 2-ThioU-ATCase, en fonction de concentrations croissantes en aspartate, exprimée en unités par mg de sous-unités 2-ThioU-catalytiques, s'est révélée être inférieure à celle des sous-unités catalytiques isolées (Chapitre I, paragraphe 1.3.1). Dans le but de déterminer si cette propriété est due à une diminution de l'activité spécifique des sous-unités 2-ThioU-catalytiques ou si les sous-unités 2-ThioU-régulatrices sont responsables, par leurs interactions avec les sous-unités catalytiques, de cette baisse d'activité, les propriétés des sous-unités catalytiques et 2-ThioU-catalytiques purifiées ont été comparées.

3.1.2.1 - Les sous-unités 2-ThioU-catalytiques ont des propriétés catalytiques modifiées

Les activités des sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU-modifiées ont été déterminées en fonction de concentrations croissantes en aspartate. Sur la figure 20, les activités de ces sous-unités catalytiques sont exprimées en fonction des molarités en aspartate selon la représentation inverse de LINEWEAVER et BURK / 60 /.

L'activité des sous-unités 2-ThioU-catalytiques est inférieure de 50 % à celle des sous-unités catalytiques. Dans le Tableau IX sont indiquées les valeurs des K_m et vitesses maxima (V_{max}) obtenues dans les cas des sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU-modifiées, par traitement des résultats selon une méthode itérative d'après CLELAND / 40 /. Tandis que la valeur de V_{max} est dans le cas des sous-unités 2-ThioU-catalytiques inférieure à celle des sous-unités catalytiques, une même valeur des K_m dans les deux cas indique que, par contre, l'affinité apparente des sites actifs n'est pas modifiée dans les sous-unités 2-ThioU-catalytiques.

Sur la figure 20 est aussi représentée l'activité de la 2-ThioU-ATCase exprimée en unités par mg de sous-unités catalytiques. Tandis que la droite représentative de cette activité croise l'axe des ordonnées pour la valeur inverse de V_{max} correspondante à celle des sous-unités 2-ThioU-catalytiques, elle croise l'axe des

FIGURE 20

Représentation selon LINEWEAVER et BURK des courbes de saturation par l'aspartate des sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU-modifiées.

0,2 µg de sous-unités catalytiques, 0,3 µg de sous-unités 2-ThioU-catalytiques, 0,5 µg de 2-ThioU-ATCase ont été incubés dans les conditions standards en présence de concentrations croissantes de $\left[^{14}C\right]$-aspartate (de 0,7 mM à 25 mM). Les vitesses initiales sont exprimées en mmoles de carbamyl aspartate formées par minute et par mg de sous-unités catalytiques. Les sous-unités 2-ThioU-catalytiques représentent 68 % du poids de l'enzyme natif.

(Δ - Δ) Sous-unités catalytiques ; (▼ - ▼) Sous-unités 2-ThioU-catalytiques ; (■ - ■) 2-ThioU-ATCase.

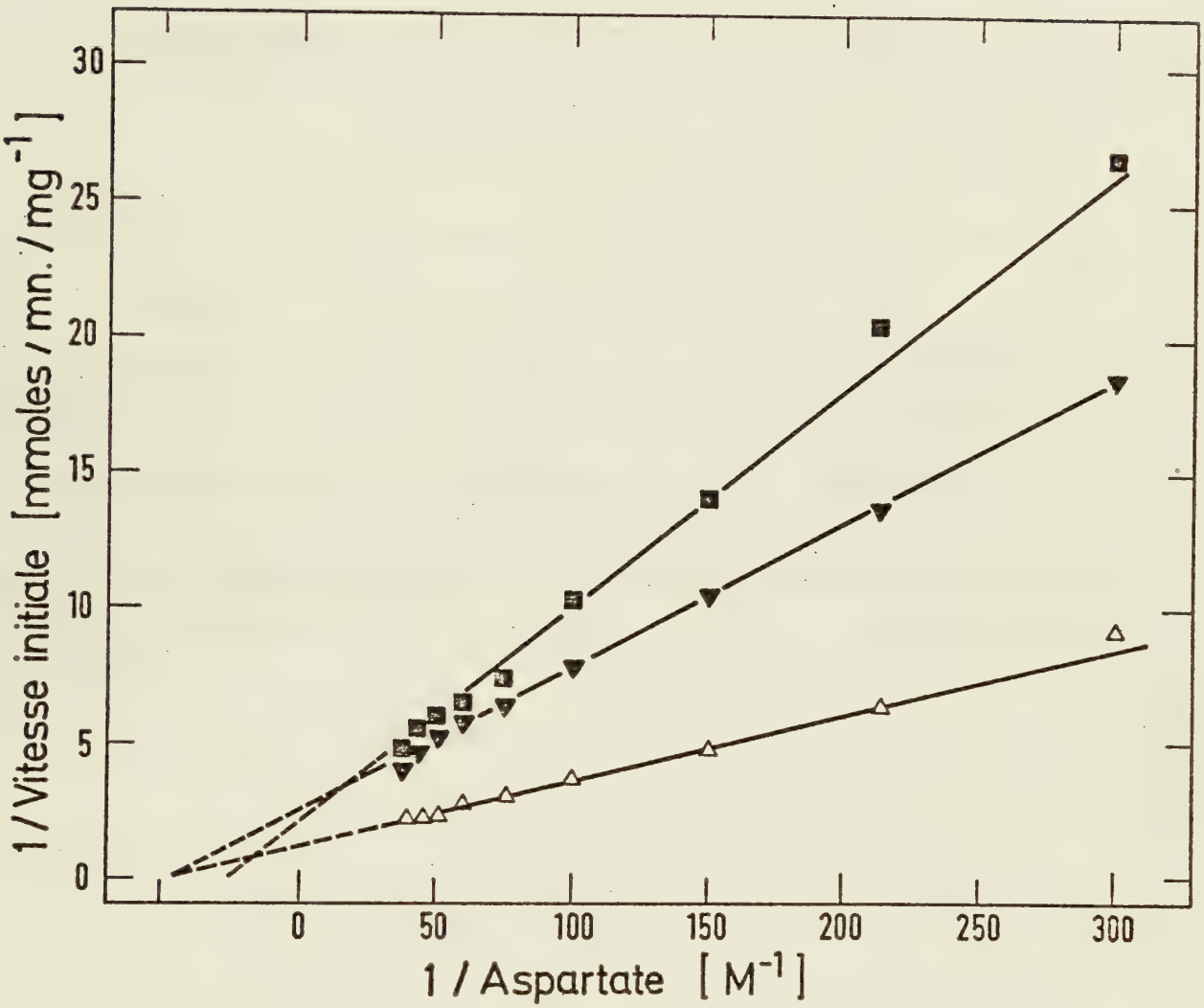

30
25
20
15
10
5
0
1 / Vitesse initiale [mmoles / mn. / mg^{-1}]
0
50
100
150
200
250
300
1 / Aspartate [M^{-1}]

TABLEAU IX

Constantes cinétiques des sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU-modifiées

Les activités enzymatiques des sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU- modifiées ont été mesurées dans les conditions standards, dans un tampon Tris-acétate 50 mM, pH 8, en présence de carbamylphosphate 5 mM et de concentrations croissantes de $\left[^{14}C\right]$-aspartate (de 0,7 mM à 25 mM). Le traitement des résultats par une méthode itérative d'après CLELAND / 40 / a été effectué de la manière décrite dans "Méthodes".

TABLEAU IX

Constantes cinétiques des sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU-modifiées

Enzymes	K_m (mM)	V_{max} (mmoles/heure/mg)
Sous-unités catalytiques	19,6 ± 1,7	47,4 ± 3,5
Sous-unités 2-ThioU-catalytiques	20,1 ± 2,2	24 ± 1,8

abscisses pour une valeur inverse du K_m différente de celle obtenue dans le cas de ces sous-unités. La comparaison des K_m indique que la 2-ThioU-ATCase présente, vis-à-vis de l'aspartate, une affinité deux fois inférieure à celle des sous-unités 2-ThioU-catalytiques. Ce résultat souligne que dans la 2-ThioU-ATCase les interactions entre sous-unités catalytiques et régulatrices imposent au niveau des sites catalytiques des contraintes conformationnelles, qui se traduisent par une diminution d'affinité des sites catalytiques pour le substrat.

Il a été largement démontré que lorsque la concentration en aspartate est faible, l'affinité des sites catalytiques pour l'aspartate en présence de carbamylphosphate saturant est dans l'ATCase plus faible que dans les sous-unités catalytiques isolées, en raison des contraintes conformationnelles dues aux interactions entre sous-unités / 11 , 58 /. Nous venons de constater qu'il en est de même dans le cas de la 2-ThioU-ATCase. En effet, l'affinité des sites dans les sous-unités 2-ThioU-catalytiques est diminuée lorsque ces sous-unités sont intégrées à l'enzyme natif. Cependant, dans le cas de l'ATCase normale, ces contraintes, qui sont plus importantes, peuvent être diminuées par la liaison coopérative du substrat, dont l'affinité vis-à-vis de l'enzyme augmente / 11 , 58 /. Par contre, l'affinité de ce substrat vis-à-vis de la 2-ThioU-ATCase n'augmente pas lorsque la concentration en aspartate croît (Chapitre I, paragraphe 1.3.1 et figures 6 et 20).

Du fait de cette différence d'affinités entre les états "contraint" (T) et "relâché" (R) de l'ATCase pour l'aspartate, l'activité par site catalytique (mesurée selon la vitesse initiale) de l'enzyme est, en présence de faibles concentrations en substrat, inférieure à celle des sous-unités catalytiques isolées (figure 6). A pH 8, lorsque la concentration en aspartate croît jusqu'à 20 mM, l'activité par site catalytique de l'ATCase rejoint celle des sous-unités isolées (figure 6 b). Au-delà de cette concentration en aspartate, l'inhibition de l'activité par excès de substrat dans le cas de l'ATCase native nuit aux comparaisons des vitesses initiales / 25 , 27 /.

Le Tableau X montre les activités, mesurées en présence de 20 mM aspartate, des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités cataly-

TABLEAU X

Activités spécifiques des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités catalytiques

200 ng de 2-ThioU-ATCase, 100 ng de sous-unités 2-ThioU-catalytiques, 100 ng d'ATCase et 100 ng de sous-unités catalytiques ont été incubées dans les conditions standards, en présence de $[^{14}C]$ -aspartate 20 mM, de carbamylphosphate 5 mM de tampon Tris-acétate 50 mM, pH 8. Les activités spécifiques ont été exprimées en unités enzymatiques par mg de protéines. Moyennes et déviations standards ont été calculées à partir de 5 à 7 déterminations. Les concentrations en protéines ont été mesurées spectrophotométriquement. Pour le calcul des activités spécifiques par m μ mole de chaînes catalytiques, il a été admis que, comme pour l'ATCase / 4 /, la molécule de 2-ThioU-ATCase contient six chaînes catalytiques de poids moléculaire 33 000, représentant 68 % du poids de l'enzyme et que les sous-unités 2-ThioU-catalytiques sont des trimères de chaînes catalytiques.

Plusieurs auteurs ont observé que l'activité spécifique de l'ATCase varie de l'ordre de 20 % d'une préparation purifiée à une autre / 25 , 34 /. La même observation a été faite dans le cas de la 2-ThioU-ATCase.

TABLEAU X

Activités spécifiques des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et de leurs sous-unités catalytiques

Enzymes	Activités spécifiques en unités / mg	Activités spécifiques en unités par m μ mole de chaînes catalytiques
ATCase	19 900 $\pm$ 900	970 $\pm$ 45
2-ThioU-ATCase	8 900 $\pm$ 800	430 $\pm$ 40
Sous-unités catalytiques	30 600 $\pm$ 800	1 010 $\pm$ 30
Sous-unités 2-ThioU-catalytiques	16 300 $\pm$ 1 600	540 $\pm$ 50

tiques. La comparaison des activités des sous-unités 2-ThioU-catalytiques et catalytiques confirme la différence de 50 % déjà observée entre leurs V_{max} (Tableau IX et figure 20). De plus, tandis que, pour cette molarité en aspartate, les activités par site catalytique de l'ATCase et des sous-unités catalytiques sont identiques, celle de la 2-ThioU-AT Case est inférieure à celle des sous-unités 2-ThioU-catalytiques. Ce résultat pouvait être attendu en raison de la différence d'affinités observée entre ces deux formes d'enzyme (voir ci-dessus et figure 20).

Deux hypothèses pouvaient expliquer la valeur inférieure de l'activité spécifique des sous-unités 2-ThioU-catalytiques, par rapport à la normale. Les sous-unités 2-ThioU-catalytiques pouvaient contenir un nombre normal de sites catalytiques deux fois moins actifs que ceux de l'ATCase, ou bien contenir un nombre inférieur de sites normalement actifs.

Dans le but de tester ces deux hypothèses, le titrage spectrophotométrique du nombre de sites catalytiques de la 2-ThioU-ATCase et de ses sous-unités, a été réalisée à l'aide du N-(phosphonacétyl)-L-aspartate (PALA).

3.1.2.2 - Titrage des sites catalytiques dans la 2-ThioU-ATCase et les sous-unités 2-ThioU-catalytiques à l'aide du PALA

Le N-(phosphonacétyl)-L-aspartate (PALA), molécule qui présente les principaux groupements fonctionnels des deux substrats de l'ATCase (figure 7), inhibe par compétitivité vis-à-vis du carbamyl-phosphate, l'activité de la 2-ThioU-ATCase et des sous-unités 2-ThioU-catalytiques, de manière analogue à celle observée pour les sous-unités catalytiques normales (Chapitre I, paragraphe 1.3.2).

La liaison du PALA aux sites catalytiques provoque, en outre, une perturbation des spectres d'absorption en ultra-violet des enzymes, perturbation identique à celle due à la liaison du succinate en présence de carbamyl phosphate / 63 , 74 /. Nous avons démontré (Chapitre 4 suivant, paragraphe 4.2) que les spectres de différence d'absorption dus à la liaison du PALA dans le cas de la 2-ThioU-ATCase et des sous-unités 2-ThioU-catalytiques sont respectivement analogues à ceux des espèces normales correspondantes.

En raison de la très grande affinité des sites catalytiques pour le PALA (mille fois plus d'affinité que pour le carbamylphosphate), cet analogue des substrats a été utilisé par COLLINS et STARK / 63 , 75 / pour titrer le nombre de sites catalytiques dans l'ATCase et les sous-unités.

L'amplitude du spectre de différence d'absorption en ultra-violet est directement proportionnelle au nombre de molécules de PALA liées, ce qui permet la détermination du nombre de sites à saturation, à condition que la concentration en protéines soit beaucoup plus grande que la constante de dissociation du PALA.

Dans le but de déterminer si la baisse de l'activité spécifique dans la 2-ThioU-ATCase résulte de l'existence d'un nombre normal de sites catalytiques moins actifs, ou d'un nombre inférieur de sites d'activité normale, cette méthode de titration spectrophotométrique a été utilisée comparativement à l'ATCase normale.

Les résultats, présentés figure 21, montrent que les sous-unités 2-ThioU-catalytiques et la 2-ThioU-ATCase (figures 21.a et 21.b) possèdent respectivement un nombre de sites capables de lier le PALA avec une forte affinité qui est inférieur d'un tiers aux trois et six sites respectivement titrés dans les cas des sous-unités catalytiques normales et de l'ATCase (figures 21.c et 21.d).

Ce résultat est statistique et révèle que la 2-ThioU-ATCase pourrait en fait correspondre à une population hétérogène de trimères de chaînes catalytiques, contenant un, deux, trois ou aucun monomère inactif avec une moyenne de un par trimère. Ce résultat pourrait aussi être dû au fait que la sous-unité 2-ThioU-catalytique serait constituée de trois chaînes assymétriques dans leur réactivité vis-à-vis du PALA. Puisque les activités spécifiques des sous-unités 2-ThioU-catalytiques sont approximativement de 50 % égales à celles des sous-unités normales (Tableau X) la baisse des activités spécifiques va de pair avec un nombre réduit des sites de haute affinité vis-à-vis du PALA.

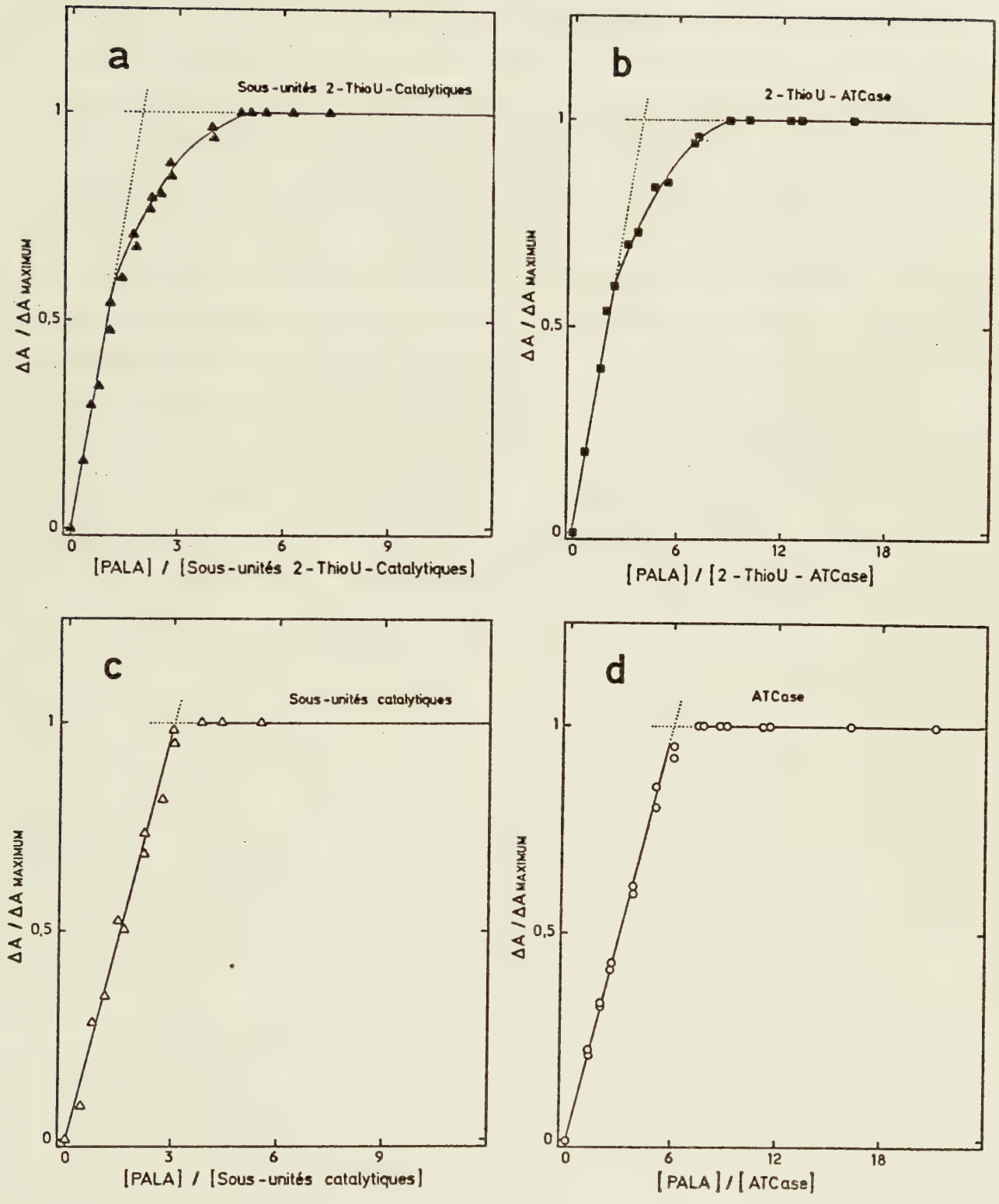
FIGURE 21

Titrages spectrophotométriques des sites catalytiques par le PALA.

1 ml d'une solution d'ATCase normale ou 2-ThioU-modifiée ou de leurs sous-unités catalytiques, aux concentrations de 2 à 3 mg par ml (de 40 µM à 65 µM en RC pour les enzymes et de 56 µM à 80 µM en C pour les sous-unités), a été introduit dans chacune des cuves de référence et de mesure du spectrophotomètre. Le titrage par le PALA a été réalisé dans les conditions décrites dans "Méthodes". Le PALA était ajouté dans la cuve dans le but d'obtenir des concentrations croissantes de 5 µM à 180 µM. Pour chaque concentration en PALA utilisée, le spectre de différence a été enregistré. Des exemples de spectres de différence dus à la liaison du PALA sont représentés sur les figures 25.a et 25.c.

La différence d'absorption, Δ A, mesurée en présence de chaque concentration en PALA correspond à l'amplitude du spectre de différence, soit entre le maximum à 290 nm et le minimum à 285,25 nm dans les cas des enzymes natifs, soit entre le maximum à 288,9 nm et le minimum à 284,5 nm dans le cas des sous-unités catalytiques.

Les résultats correspondent à deux ou trois expériences de titrages.


a
Sous-unités 2-ThioU-Catalytiques
ΔA / ΔA MAXIMUM
1
0,5
0
0
3
6
9
[PALA] / [Sous-unités 2-ThioU-Catalytiques]
b
2-ThioU-ATCase
ΔA / ΔA MAXIMUM
1
0,5
0
0
6
12
18
[PALA] / [2-ThioU-ATCase]
c
Sous-unités catalytiques
ΔA / ΔA MAXIMUM
1
0,5
0
0
3
6
9
[PALA] / [Sous-unités catalytiques]
d
ATCase
ΔA / ΔA MAXIMUM
1
0,5
0
0
6
12
18
[PALA] / [ATCase]

Les sous-unités 2-ThioU-catalytiques sont donc modifiées, ce qui se révèle non seulement par une migration électrophorétique inférieure à la normale (Chapitre I, paragraphe 1.1.5.2), mais aussi par des propriétés spectroscopiques et catalytiques particulières. Les propriétés spectroscopiques de ces sous-unités sont, pour une grande part, responsables de la différence qui existe entre les spectres d'absorption en ultra-violet et entre les spectres de dichroïsme circulaire de l'ATCase et de la 2-ThioU-ATCase. L'association des sous-unités régulatrices aux sous-unités catalytiques dans les enzymes natifs peut néanmoins modifier les propriétés spectroscopiques caractéristiques de ces sous-unités, ce qui expliquerait pourquoi le spectre de l'enzyme natif n'est pas toujours superposable à la somme des spectres des sous-unités isolées (spectres d'absorption en ultra-violet de la 2-Thio-ATCase et spectre de dichroïsme circulaire de l'ATCase). Les sous-unités 2-ThioU-catalytiques sont aussi modifiées dans leurs propriétés catalytiques et possèdent une V_{max} inférieure de 50 % à la normale. Cette diminution de l'activité spécifique coïncide avec l'existence de deux au lieu de trois sites de forte affinité pour le PALA par sous-unité.

3.2 - Les Sous-Unités Régulatrices sont Responsables de la Perte des Interactions Coopératives entre Sites Catalytiques pour l'Aspartate dans la 2-ThioU-ATCase

Les résultats précédents ont montré que les sous-unités 2-ThioU-catalytiques, bien que modifiées dans leur activité catalytique, ont gardé, au sein de la molécule native, de fortes interactions avec les sous-unités 2-ThioU-régulatrices.

Le fait que la 2-ThioU-ATCase soit l'objet d'interactions hétérotropes (Chapitre 2) indique en effet que la fixation des effecteurs aux sites régulateurs module l'activité des sites catalytiques par l'intermédiaire d'interactions entre les deux types de sous-unités. D'autre part, l'association des sous-unités régulatrices aux sous-unités catalytiques impose au niveau des sites catalytiques des contraintes telles que l'affinité de l'aspartate vis-à-vis de ces sites diminue (Chapitre 3, paragraphe 3.1.2.1). Enfin, nous démontrerons plus loin, Chapitre 4, que la liaison des substrats aux sites catalytiques de la 2-ThioU-ATCase induit des changements de conformation supplémentaires à ceux observés au cours de la liaison aux seules sous-unités 2-ThioU-catalytiques. Cependant les interactions entre sous-unités catalytiques et régulatrices dans la 2-ThioU-ATCase ne sont pas suffisantes pour que cet enzyme soit l'objet d'interactions homotropes coopératives entre sites catalytiques.

Considérant ces propriétés particulières à la 2-ThioU-ATCase, il était intéressant de déterminer lesquelles des sous-unités catalytiques ou régulatrices sont responsables de la perte des interactions coopératives entre sites catalytiques. Pour ce faire, le comportement de molécules hybrides constituées de l'association de sous-unités normales et 2-ThioU-modifiée a été étudié.

Il a été montré par GERHART et SCHACHMAN /3 /, que les sous-unités catalytiques et les sous-unités régulatrices obtenues par dissociation de l'ATCase par le PHMB peuvent, dans des conditions appropriées, reformer un enzyme actif, possédant 80 à 90 % de ses propriétés originales / 8 , 11 /. Cette recombinaison requiert la présence de zinc, qui est impliqué dans l'association des sous-unités /8 , 11, 12, 1

La 2-ThioU-ATCase a été dissociée par le PHMB selon le procédé décrit dans "Méthodes", en sous-unités 2-ThioU-catalytiques et 2-ThioU-régulatrices. Quand ces deux types de sous-unités sont recombinées dans les conditions décrites dans "Méthodes", un enzyme possédant toutes les propriétés de la 2-ThioU-ATCase a été obtenu. Comme dans le cas de l'ATCase normale, la sensibilité au CTP de l'enzyme modifié reconstitué était significativement plus faible qu'avant dissociation. Ceci est montré Tableau XI où il est indiqué qu'en présence d'aspartate 5 mM le CTP 0,5 mM inhibe l'ATCase normale de 52 % ± 3 % avant dissociation et réassociation et 50 % ± 8 % après. La 2-ThioU-ATCase est inhibée de 34 % ± 3 % avant dissociation et réassociation et 24 % ± 6 % après.

Dans le but d'analyser les propriétés particulières aux sous-unités 2-ThioU-modifiées, les molécules "hybrides" d'enzymes faites de sous-unités normales et 2-ThioU-modifiées ont été préparées. L'efficacité de la recombinaison a été vérifiée par électrophorèse des échantillons réassociés sur gels de polyacrylamide dans les conditions standards décrites dans "Méthodes". Le résultat de ces analyses électrophorétiques, qui sont montrés sur le Cliché 4, indique que les sous-unités constitutives des "molécules hybrides" se sont associées aussi efficacement que dans les ATCase et 2-ThioU-ATCase réassociées. Dans tous les cas, outre la bande principale d'enzyme réassocié, un très faible pourcentage d'un aggrégat est observé. Cet aggrégat de plus haut poids moléculaire a été souvent observé au cours de la recombinaison des sous-unités de l'ATCase / 10 , 12 , 13 /. Il a été vérifié que cet aggrégat se comporte exactement comme l'enzyme normal reconstitué / 13 / et qu'il s'agit d'une forme dimérique de l'ATCase.

Ces différents hybrides ont été ensuite testés pour les propriétés qui différencient l'ATCase normale et 2-ThioU-ATCase (dépendance vis-à-vis du pH, sensibilité au CTP), ainsi que pour l'existence ou l'absence d'interactions coopératives entre sites catalytiques. Le Tableau XI indique les rapports d'activités à pH 7 et 8,4 et les pourcentages de rétroinhibition par le CTP 0,5 mM de ces différentes espèces moléculaires, en comparaison avec ceux des ATCases normale et modifiée non dissociées. En tenant compte de l'effet de la dissociation et réassociation sur la dépendance

CLICHE 4

Analyses par électrophorèses, sur gels d'acrylamide des ATCases reconstituées à partir de sous-unités normales et 2-ThioU-modifiées.

Après dissociation des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée, les sous-unités isolées ont été réassociées pour l'obtention de molécules hybrides d'ATCase et de 2-ThioU-ATCase. Ces espèces enzymatiques ont été analysées par électrophorèse sur gels de polyacrylamide dans les conditions décrites dans "Méthodes". 5µg de chaque protéine ont été déposés sur le gel.

1 - ATCase non dissociée et sous-unités catalytiques ; 2 - ATCase reconstituée ; 3 - Enzyme reconstituée à partir de sous-unités catalylitiques normales et 2-ThioU-régulatrices ; 4 - Enzyme reconstituée à partir de sous-unités 2-ThioU-catalytiques et régulatrices normales ; 5 - 2-ThioU-ATCase reconstituée ; 6 - 2-ThioU-ATCase non dissociée et sous-unités 2-ThioU-catalytiques ; 7 - Sous-unités régulatrices.

Un excès de sous-unités régulatrices est observé dans les gels 2 et 4.

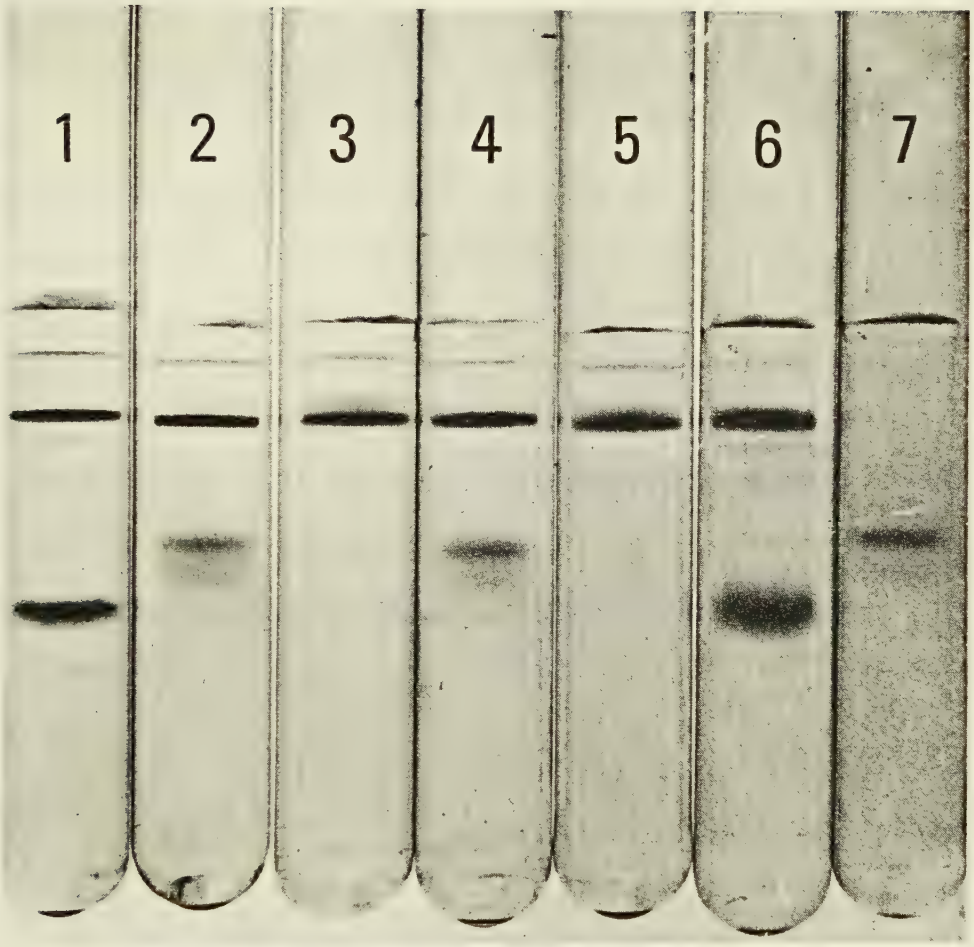

1
2
3
4
5
6
7

TABLEAU XI

Comportement des ATCases reconstituées à partir des sous-unités normales et modifiées

0,4 μg d'ATCase non dissociée, 0,5 μg de 2-ThioU-ATCase non dissociée et 0,57 μg de chacune des préparations suivantes : ATCase reconstituée, 2-ThioU-ATCase reconstituée, enzyme hybride faite de sous-unités 2-ThioU-catalytiques et régulatrices normales, enzyme hybride faite de sous-unités 2-ThioU-régulatrices et catalytiques normales, ont été incubés dans les conditions décrites dans "Méthodes" pour l'étude du rapport des activités à pH 7 et pH 8,4 et du pourcentage d'inhibition par le CTP 0,5 mM.

Moyennes et déviations standards ont été calculées à partir de 5 à 8 déterminations faites sur deux préparations différentes de chaque enzyme reconstitué et hybride.

TABLEAU XI

Comportement des ATCases reconstituées à partir des sous-unités normales et modifiées

	Rapport des activités pH = 7 : pH = 8,4	Inhibition par CTP 5×10^{-4} M
ATCase non dissociée	2,36 ± 0,25	52 ± 3
2-ThioU-ATCase non dissociée	0,98 ± 0,06	34 ± 3
ATCase reconstituée	2,01 ± 0,29	50 ± 8
2-ThioU-ATCase reconstituée	0,83 ± 0,14	24 ± 6
2-ThioU-Catalytique plus Régulatrice normale	1,48 ± 0,46	48 ± 8
2-ThioU-Régulatrice plus Catalytique normale	0,83 ± 0,17	21 ± 7

vis-à-vis du pH et la sensibilité au CTP précédemment mentionné, il est constaté que l'hybride formé de sous-unités 2-ThioU-catalytiques et de sous-unités régulatrices se comporte comme une ATCase normale reconstituée, tandis qu'au contraire, l'hybride formé de sous-unités catalytiques et de sous-unités 2-ThioU-régulatrices se comporte comme la 2-ThioU-ATCase reconstituée.

Ces deux hybrides ont été également testés pour l'existence des interactions coopératives entre sites catalytiques en comparaison avec les ATCase et 2-ThioU-ATCase reconstituées. La figure 22 montre les relations entre vitesses initiales et concentrations en aspartate, dans les conditions standards, ainsi que les représentations inverses correspondantes selon LINEWEAVER et BURK. Les résultats suivants ont été obtenus :

a) L'ATCase normale reconstituée montre toujours l'existence des interactions coopératives (figure 22.a).

b) La 2-ThioU-ATCase reconstituée ne présente toujours pas d'interactions homotropes coopératives (figure 22.b).

c) Des deux hybrides, seul celui formé des sous-unités 2-ThioU-catalytiques et régulatrices normales montre les interactions homotropes coopératives (figure 22.b). L'hybride formé de sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU-régulatrices se comporte selon une cinétique de type MICHAËLIS-MENTEN, comme la 2-ThioU-ATCase native (figure 22.a).

Ces résultats, ainsi que ceux qui sont présentés dans le Tableau XI montrent que la cause de la perte des interactions homotropes coopératives entre sites catalytiques dans la 2-ThioU-ATCase est une modification au niveau des sous-unités régulatrices. Il est donc très intéressant de remarquer qu'une conformation très précise des sous-unités régulatrices est plus importante pour l'existence d'interactions entre sites catalytiques, que pour l'existence des interactions antagonistes entre sites catalytiques et régulateurs, dans lesquelles ces sous-unités régulatrices sont directement impliquées.

FIGURE 22 a

Dépendance de la vitesse initiale vis-à-vis de la concentration en aspartate des ATCases reconstituées à partir des sous-unités normales et modifiées.

L'ATCase reconstituée (0,3 µg), l'enzyme hybride fait de sous-unités catalytiques et de sous-unités 2-ThioU-régulatrices (0,3 µg) ont été testés pour leur activité dans les conditions standards décrites dans "Méthodes", en présence de quantités croissantes d'aspartate (de 0,7 mM à 25 mM). Les courbes en encart représentent l'influence de la concentration en aspartate sur les vitesses initiales exprimées en µmoles de $\left[^{14}C\right]$ -carbamylaspartate formées dans les conditions standards par mg de sous-unités catalytiques contenues dans les hybrides ou les enzymes reconstitués.

Les courbes principales correspondent à l'expression des mêmes résultats selon la représentation de LINEWEAVER-BURK.

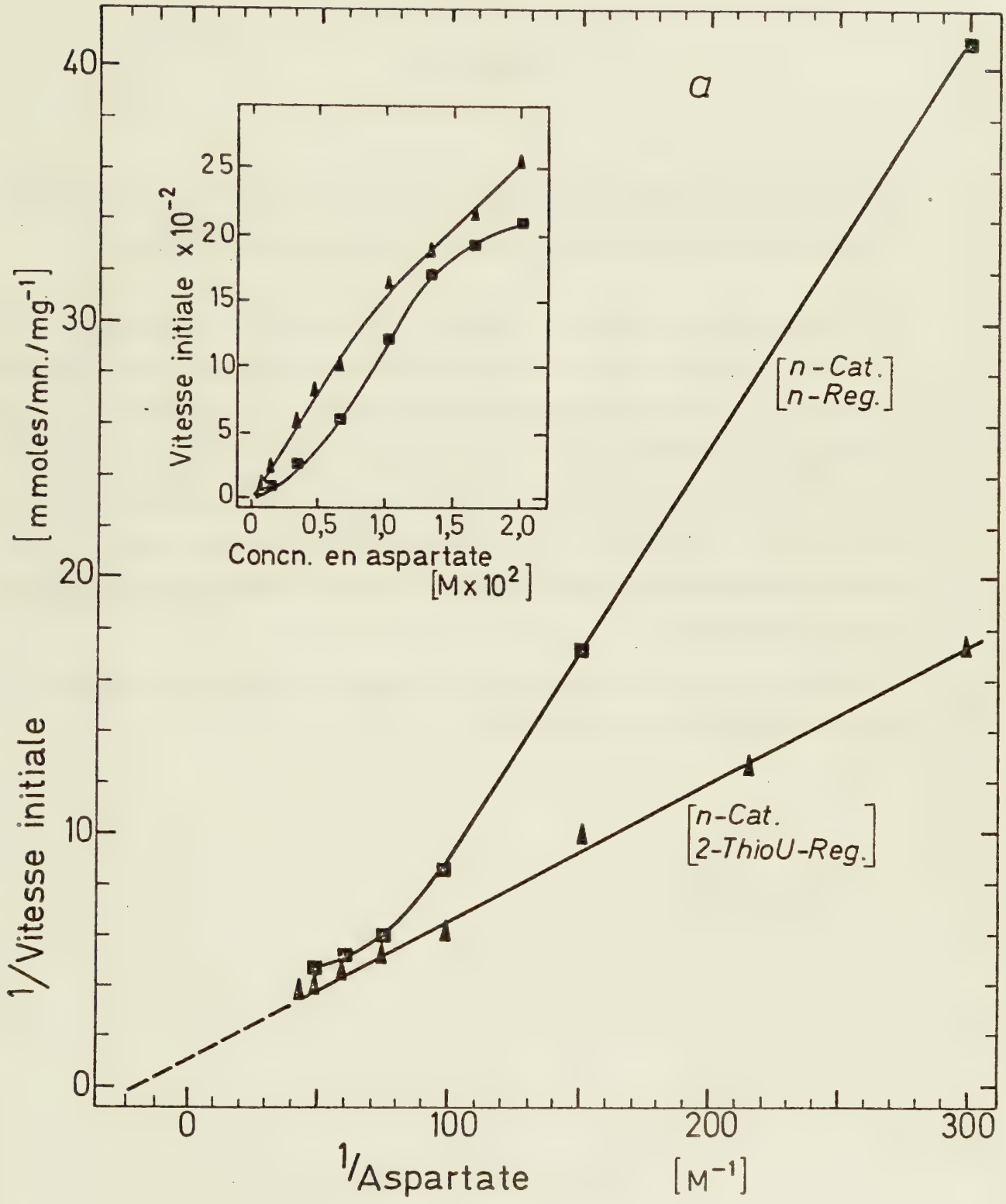
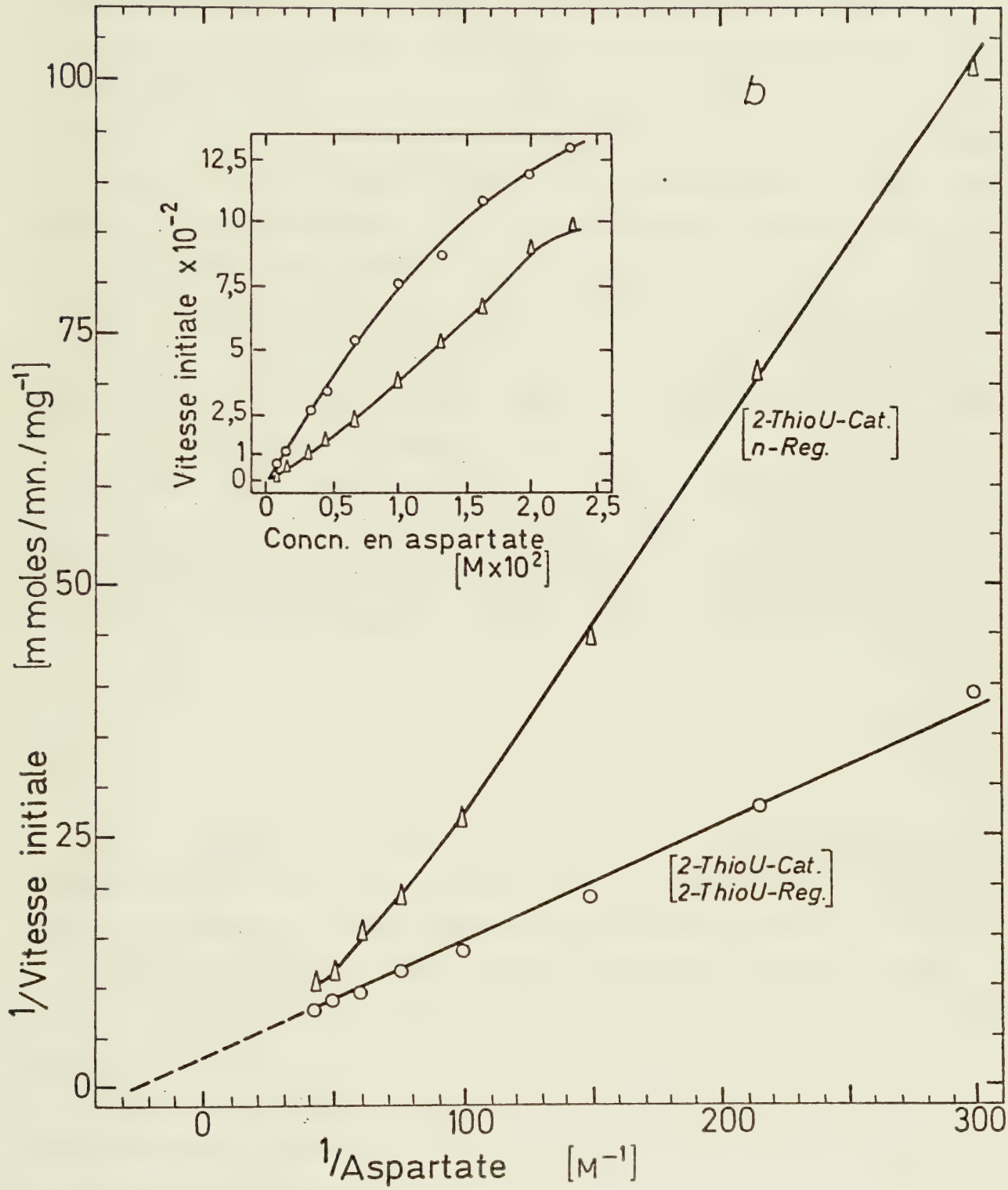

a
40
30
20
10
0
[m moles/mn./mg⁻¹]
1/Vitesse initiale
0
100
200
300
1/Aspartate
[M⁻¹]
[n-Cat.
n-Reg.]
[n-Cat.
2-ThioU-Reg.]
Vitesse initiale x10⁻²
25
20
15
10
5
0
0
0,5
1,0
1,5
2,0
Concn. en aspartate
[M x 10²]

FIGURE 22 b

Dépendance de la vitesse inititale vis-à-vis de la concentration en aspartate des ATCases reconstituées à partir des sous-unités normales et modifiées.

La 2-ThioU-ATCase reconstituée (0,6 µg), et l'enzyme hybride fait de sous-unités 2-ThioU-catalytiques et de sous-unités régulatrices normales (0,7 µg) ont été testés pour leur activité dans les conditions standards décrites dans "Méthodes", en présence de quantités croissantes d'aspartate (de 0,7 mM à 25 mM). Les courbes en encart représentent l'influence de la concentration en aspartate sur les vitesses initiales exprimées en µ moles de $\left[^{14}C\right]$-carbamylaspartate formées dans les conditions standards par mg de sous-unités catalytiques contenues dans les hybrides ou les enzymes reconstitués.

Les courbes principales correspondent à l'expression des mêmes résultats selon la représentation de LINEWEAVER-BURK.


b
100
75
50
25
0
1/Vitesse initiale [m moles/mn./mg⁻¹]
0
100
200
300
1/Aspartate [M⁻¹]
[2-ThioU-Cat. n-Reg.]
[2-ThioU-Cat. 2-ThioU-Reg.]
Vitesse initiale x 10⁻²
12,5
10
7,5
5
2,5
1
0
0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
Concn. en aspartate [M x 10²]

Cependant le rôle des sous-unités 2-ThioU-régulatrices envers les propriétés catalytiques de la 2-ThioU-ATCase n'est pas négligeable. En effet, nous avons déjà constaté (Chapitre 3 , paragraphe 3.1.2.1 et figure 20) que l'affinité de la 2-ThioU-ATCase vis-à-vis de l'aspartate était deux fois inférieure à celle des sous-unités 2-ThioU-catalytiques isolées, propriété liée à l'existence de contraintes conformationnelles imposées au niveau des sites catalytiques par les interactions entre sous-unités régulatrices et sous-unités catalytiques. L'importance des interactions entre sous-unités régulatrices et catalytiques dans la diminution de l'affinité des sites catalytiques vis-à-vis de l'aspartate a, en outre, été étudiée dans l'hybride formé des sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU-régulatrices, molécule qui ne présente pas les effets coopératifs (figure 22.a). Sur le Tableau XII sont indiquées les valeurs des K_m et V_{max} obtenus dans le cas de cet hybride et de la 2-ThioU-ATCase reconstituée, par traitements des résultats selon une méthode itérative d'après CLELAND / 40 /. Il est intéressant de constater que, tandis que les V_{max}, exprimées en unités par mg de sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU-modifiées sont respectivement analogues à celles de ces sous-unités isolées (Tableau IX), les affinités vis-à-vis de l'aspartate, comparées à celles des sous-unités (Tableau IX) diminuent de deux fois lorsque ces sous-unités sont associées aux sous-unités 2-ThioU-régulatrices.

Les deux espèces de sous-unités catalytiques et régulatrices sont donc modifiées dans la 2-ThioU-ATCase. Les sous-unités 2-ThioU-catalytiques ont des propriétés spectroscopiques et électrophorétiques différentes de celles des sous-unités catalytiques, et sont deux fois moins actives que ces dernières. La modification au niveau des sous-unités 2-ThioU-régulatrices est responsable de la perte des interactions homotropes coopératives pour la fixation de l'aspartate. Néanmoins ces sous-unités 2-ThioU-régulatrices, par leur association avec les sous-unités 2-ThioU-catalytiques demeurent capables d'exercer une influence sur l'affinité des sites actifs vis-à-vis de l'aspartate.

TABLEAU XII

Constantes cinétiques des enzymes reconstitués à partir des sous-unités 2-ThioU-régulatrices

Les activités enzymatiques des enzymes reconstitués ont été mesurées dans les conditions standards, dans un tampon Tris-acétate 50 mM, pH 8,0, en présence de carbamylphosphate 5 mM et de concentrations croissantes de $[^{14}C]$-aspartate (de 0,7 mM à 25 mM). Les valeurs des V_{max} sont exprimées par mg de sous-unités catalytiques contenus dans chaque espèce enzymatique. Le traitement des résultats par une méthode itérative d'après CLELAND / 40 / a été effectué de la manière décrite dans "Méthodes".

TABLEAU XII

Constantes cinétiques des enzymes reconstitués à partir de sous-unités 2-ThioU-régulatrices

Enzymes	K_m (mM)	V_{max} (mmoles/heure/mg)
[Catalytiques 2-ThioU-Régulatrices	40,3 ± 5,3	45 ± 4,8
[2-ThioU-Catalytiques 2-ThioU-Régulatrices	48,1 ± 6,8	24,6 ± 3

4 - CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS DUS A LA LIAISON DES SUBSTRATS A LA 2-THIOURACILE-ASPARTATE TRANSCARBAMYLASE

L'ATCase et les sous-unités catalytiques sont l'objet de changements conformationnels consécutifs à la fixation des substrats ou d'analogues de substrats / 24 , 63 , 74 , 76 , 77 /. De plus, des changements conformationnels supplémentaires à ceux correspondant aux seules sous-unités catalytiques sont observés lorsque ces sous-unités sont incorporées dans l'ATCase native.. KIRSHNER et SCHACHMAN ont en effet montré que la fixation de succinate (analogue de l'aspartate), en présence de carbamylphosphate provoque une diminution du coefficient de sédimentation de l'ATCase, tandis que celui des sous-unités catalytiques isolées augmente dans les mêmes conditions. Ainsi, bien que les sous-unités catalytiques acquièrent une structure plus "compacte", la structure quaternaire de l'ATCase native devient, par suite des interactions entre sous-unités, plus "relâchée" / 22 /. Par l'étude des spectres de différence en dichroïsme circulaire, J. GRIFFIN a, d'autre part, montré que la liaison de ces deux ligands à l'ATCase native provoque dans l'environnement de résidus tyrosyls, une perturbation non observée lors de l'association de ces mêmes molécules aux sous-unités catalytiques isolées dans les mêmes conditions / 43 /. Bien qu'il ne soit pas formellement démontré que les sous-unités catalytiques intégrées au complexe soient l'objet des mêmes changements de conformation que lorsqu'elles sont à l'état isolé, KIRSHNER et SCHACHMAN / 23 / ont obtenu des évidences indiquant qu'aux changements conformationnels locaux, additifs et directement liés à la saturation des sites actifs, se superposant dans l'ATCase une transconformation supplémentaire concertée, indirectement liée à la fixation des substrats, et due à l'existence d'interactions entre sous-unités.

Puisque la 2-ThioU-ATCase ne présente plus les interactions homotropes entre sites catalytiques, l'analyse des changements conformationnels induits par la fixation des substrats à cet enzyme a été réalisée dans le but d'observer directement si la perte des effets coopératifs se traduit par l'abolition d'une (ou de plusieurs) transconformation(s) locale(s) ou globale(s) de la molécule.

4.1 - Etude des Changements Conformationnels par Spectroscopie de Dichroïsme Circulaire

Les spectres de différence de dichroïsme circulaire entre 250 nm et 400 nm obtenus par fixation du carbamylphosphate à la 2-ThioU-ATCase et aux sous-unités 2-ThioU-catalytiques ont été enregistrés selon la technique décrite dans "Méthodes", et comparés à ceux des espèces enzymatiques normales. Comme le montre la figure 23, la liaison du carbamylphosphate à la 2-ThioU-ATCase et aux sous-unités 2-ThioU-catalytiques (figure 23.a) provoque des changements conformationnels analogues à ceux correspondants aux espèces enzymatiques normales (figure 23.b). En outre, la liaison du carbamylphosphate à la 2-ThioU-ATCase, comme à l'ATCase, provoque un changement conformationnel supplémentaire à celui qui est observé lorsque ce substrat se lie aux sous-unités catalytiques isolées. En effet, pour les longueurs d'onde inférieures à 292 nm, les spectres de différence qui correspondent aux sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU-modifiées ne sont plus superposables à ceux des enzymes non dissociés, indiquant dans ces derniers des perturbations supplémentaires autour de résidus tyrosines / 72 , 73 /. La valeur maximale de $\Delta [\Theta]$ à 278 nm est cependant de 35 % inférieure dans le cas des protéines 2-ThioU-modifiées.

Les spectres de différence de dichroïsme circulaire dus à la liaison du succinate, en présence de carbamylphosphate à la 2-ThioU-ATCase et aus sous-unités 2-ThioU-catalytiques sont comparés sur la figure 24 aux spectres obtenus dans le cas des espèces enzymatiques normales. Bien que l'amplitude maximale $\Delta [\Theta]$ à 290 nm soit réduite de 50 % dans le cas des enzymes 2-ThioU-modifiés, les spectres obtenus sont qualitativement analogues à ceux qui correspondent aux enzymes normaux, et présentent à 290 nm le pic caractéristique de perturbations au niveau de résidus tryptophanes / 73 , 78 /.

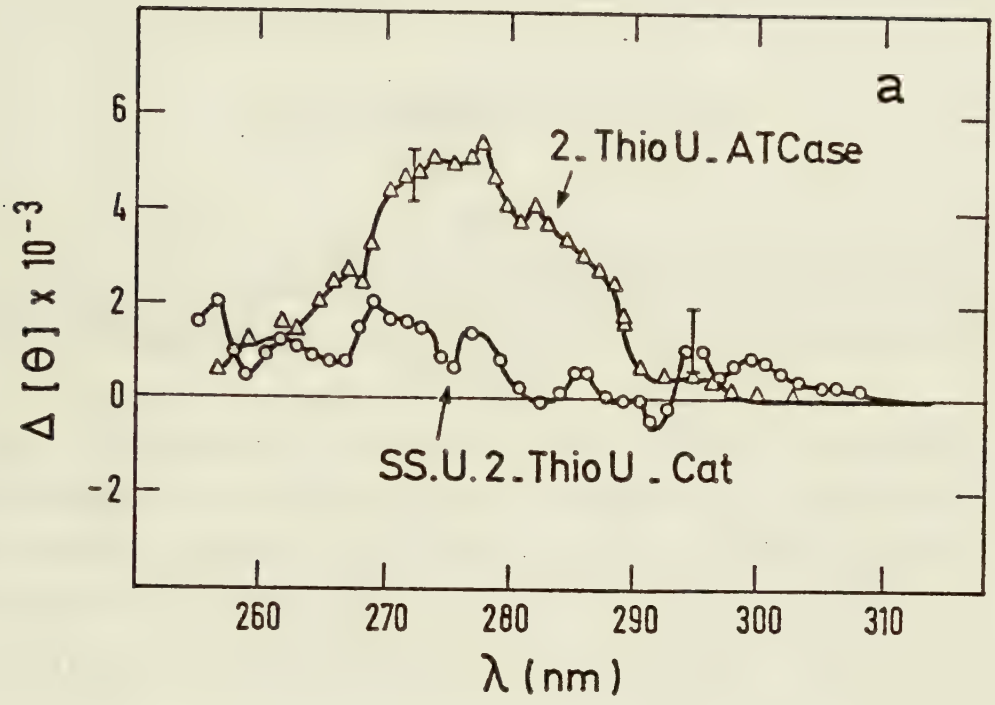
Les réductions de 30 % et 50 % des valeurs de $\Delta [\Theta]$ peuvent être dues à la réduction du nombre de sites de forte affinité pour les substrats, identique à celle observée pour l'analogue des deux substrats N-(phosphonacétyl)-L-aspartate (Chapitre 3, paragraphe 3.1.2.2).

FIGURE 23

Spectres de différence de dichroïsme circulaire dus à la liaison du carbamyl-phosphate aux ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et à leurs sous-unités catalytiques.

Les spectres de différence ont été enregistrés de la manière décrites dans "Méthodes". Les enzymes, en solutions dans un tampon imidazole-acétate 0,04 M, pH 7,0, contenant du β-mercapto-éthanol 2 mM et de l'EDTA 0,2 mM, étaient présents aux concentrations de 1,5 à 2 mg/ml. La concentration finale en carbamyl-phosphate était de 2,5 mM. Les valeurs des différences d'ellipticités molaires, $\Delta[\Theta]$, sont exprimées en unités de deg.cm^2 par d.mole de protomères RC pour les enzymes natifs ou de chaînes polypeptidiques, C, pour les sous-unités catalytiques isolées.

a) Spectres de différence dus à la liaison du carbamyl-phosphate à la 2-ThioU-ATCase (△ - △) et aux sous-unités 2-ThioU-catalytiques (o - o).
b) Spectres de différences dus à la liaison du carbamyl-phosphate à l'ATCase (□ - □) et aux sous-unités catalytiques (■ - ■).


a
2-Thio U-ATCase
SS.U.2-Thio U - Cat
Δ [θ] x 10⁻³
6
4
2
0
-2
260
270
280
290
300
310
λ (nm)

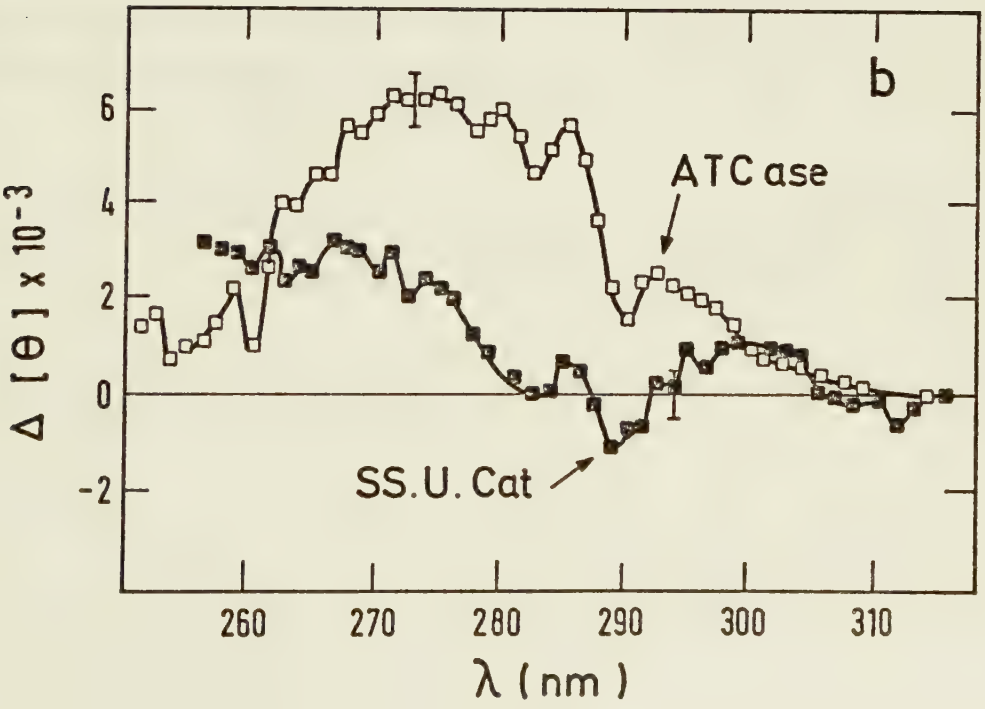

b
ATC ase
SS.U. Cat
Δ [θ] x 10⁻³
6
4
2
0
-2
260
270
280
290
300
310
λ (nm)

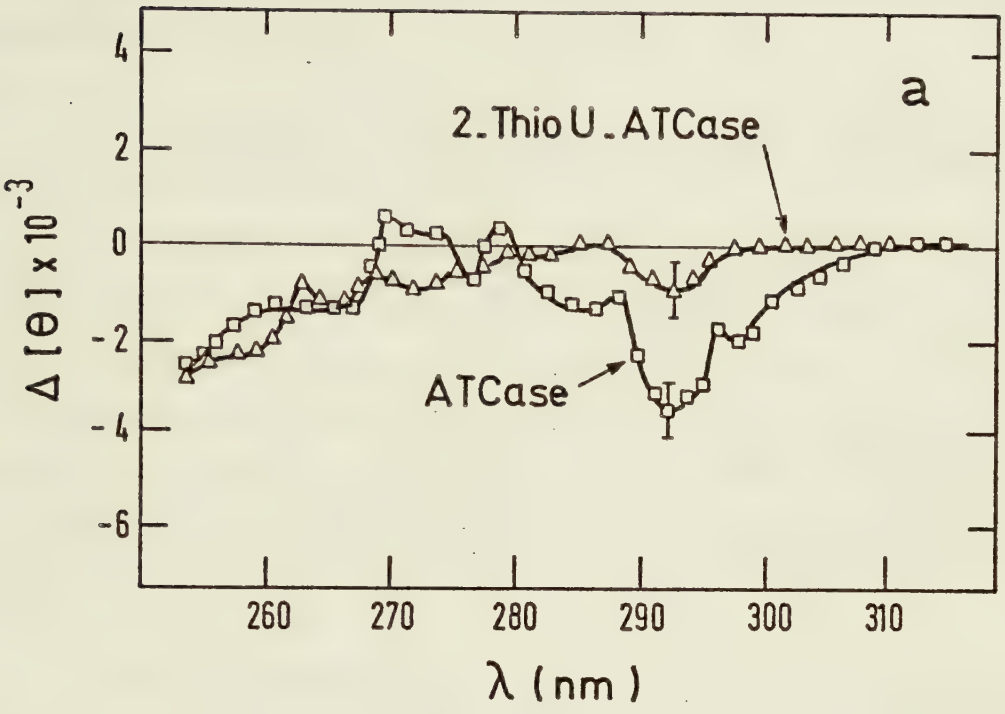
FIGURE 24

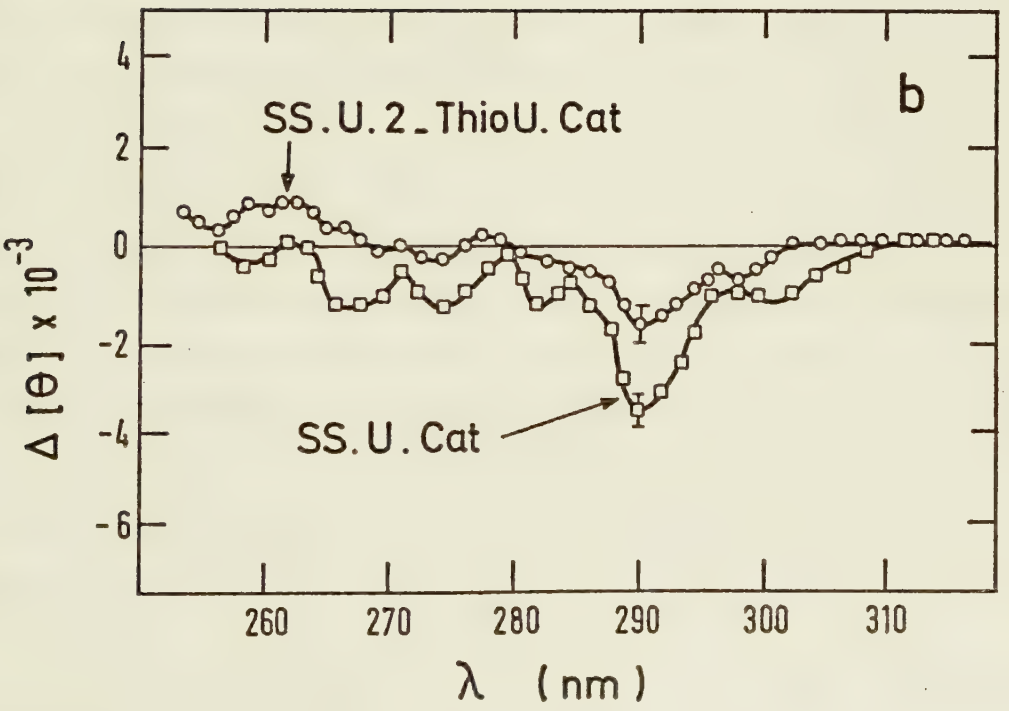
Spectres de différence de dichroïsme circulaire dus à la liaison du succinate aux ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et à leurs sous-unités catalytiques.

Les spectres de différence ont été enregistrés de la manière décrite dans "Méthodes". Le succinate, à une concentration finale de 10,0 mM, a été ajouté aux solutions précédemment décrites figure 23 contenant les protéines et le carbamyl-phosphate. Les valeurs de $\Delta[\Theta]$ sont exprimées par unités de deg.cm^2 par d.mole de protomères RC pour les enzymes natifs ou de chaînes polypeptidiques, C, pour les sous-unités catalytiques.

a) Comparaison des spectres de différence dus à la liaison du succinate à la 2-ThioU-ATCase (△ - △) et à l'ATCase (□ - □).

b) Comparaison des spectres de différence obtenus dans le cas des sous-unités 2-ThioU-catalytiques (○ - ○) et des sous-unités catalytiques (□ - □).


a
2-Thio U-ATCase
ATCase
Δ [θ] x 10^-3
λ (nm)
4
2
0
-2
-4
-6
260
270
280
290
300
310


b
SS.U.2-ThioU.Cat
SS.U.Cat
Δ [θ] x 10^-3
λ (nm)
4
2
0
-2
-4
-6
260
270
280
290
300
310

Ces résultats montrent donc que dans la 2-ThioU-ATCase, les forces d'interactions entre sous-unités, bien qu'affaiblies de telle sorte que les effets, homotropes coopératifs ont disparu, demeurent suffisantes pour que la liaison des substrats aux sites actifs induisent des changements conformationnels supplémentaires à ceux qui sont observés dans le cas des sous-unités catalytiques isolées.

4.2 - Etude des Changements de Conformation par Spectroscopie d'Absorption en Ultra-Violet

Les changements conformationnels des sous-unités catalytiques isolées et de l'ATCase provoqués par la liaison du succinate en présence de carbamyl-phosphate sont de plus aisément observés par l'analyse des spectres de différence d'absorption en ultra-violet / 63 , 74 / . COLLINS et STARK ont montré que lorsque le N-(phosphonacétyl)-L-aspartate (PALA), analogue des deux substrats, remplace ceux-ci, le spectre de différence obtenu est le même que celui obtenu en présence de carbamyl-phosphate et de succinate / 63 , 74 /. Ces spectres de différence résultent principalement de perturbations dans l'environnement de résidus tryptophanes et tyrosines / 63 , 74 /.

Les spectres de différence d'absorption en ultra-violet produits par la liaison du PALA aux sous-unités 2-ThioU-catalytiques et aux sous-unités catalytiques ont été enregistrés selon la technique décrite dans "Méthodes" et sont présentés figures 25.a et 25.c. Ces deux spectres sont qualitativement semblables, ayant les mêmes longueurs d'onde de 281,3 nm et 288,9 nm pour les maxima, et de 284,5 nm et 294,8 nm pour les minima. Cependant, la valeur absolue de l'amplitude du spectre de différence obtenu dans le cas des sous-unités 2-ThioU-catalytiques est approximativement de 65 % égale à celle observée dans le cas des sous-unités catalytiques. Ce phénomène, qui existe également entre les spectres de différence de dichroïsme circulaire (Chapitre 4, paragraphe 4.1), doit probablement résulter de la présence démontrée Chapitre 3 (paragraphe 3.1.2.2) d'un nombre inférieur des sites de forte affinité pour le PALA dans les sous-unités 2-ThioU-catalytiques par rapport aux sous-unités catalytiques. Cette observation doit aussi être liée à l'existence d'une différence entre les valeurs des activités spécifiques déterminées pour les deux espèces de sous-unités (Chapitre 3, paragraphe 3.1.2.1).

Les spectres de différence d'absorption consécutifs à la liaison du PALA aux ATCases normale et 2-ThioU-modifiée ont également été enregistrés. Les figures 25.a et 25.c montrent que les spectres de différence d'absorption en ultra-violet sont

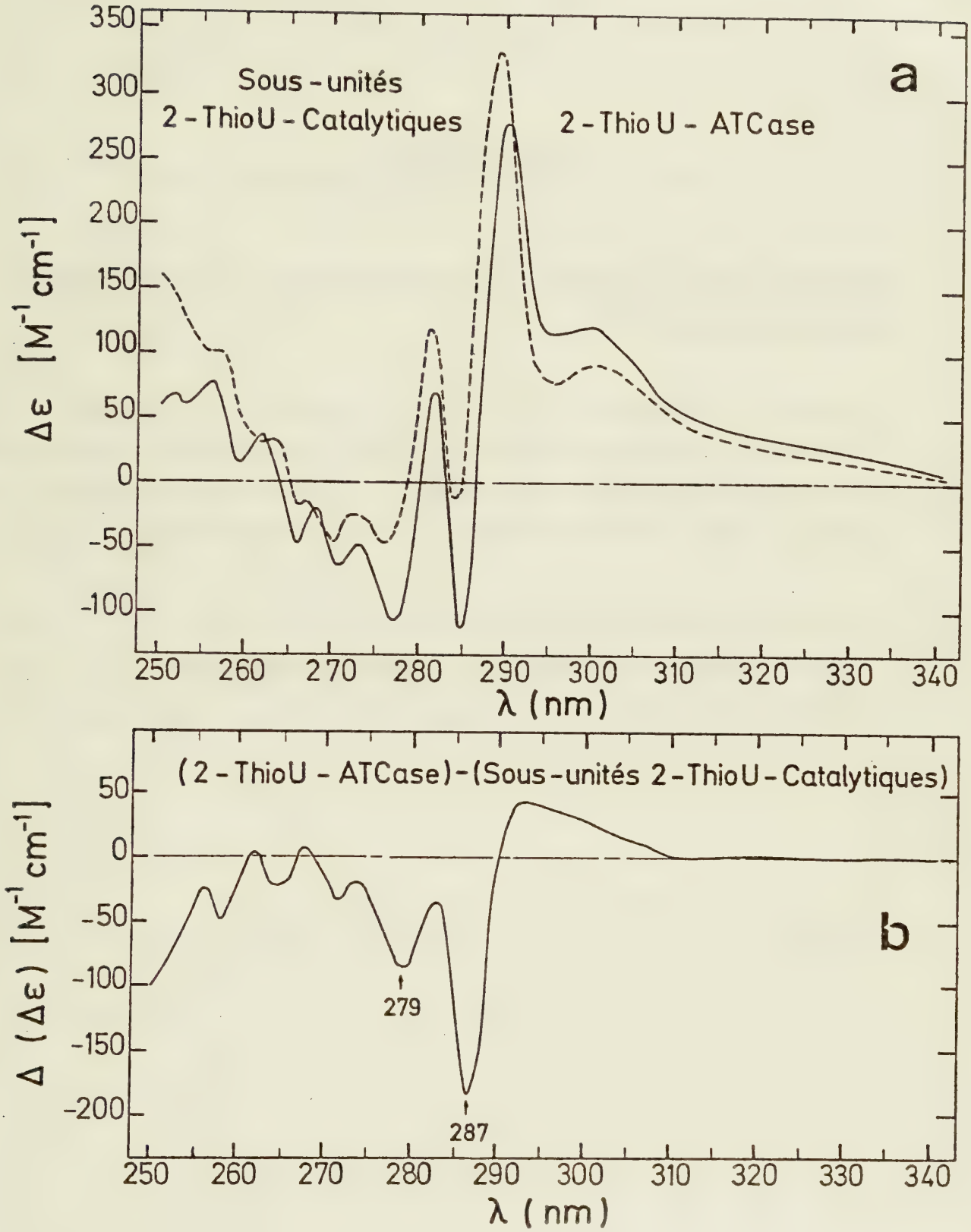
FIGURES 25 a et b

Spectres de différence d'absorption de la 2-ThioU-ATCase et des sous-unités 2-ThioU catalytiques produits par le PALA.

Les spectres de différence ont été obtenus dans les conditions décrites dans "Méthodes en présence de concentrations saturantes de PALA. Les différences d'absorption sont exprimées par mole de chaînes catalytiques C ou par mole de protomères RC . Les poids moléculaires de 33 000 et 50 000 daltons ont été respectivement utilisés.

a) Spectres de différence d'absorption observés dus à la liaison du PALA aux sous-unités 2-ThioU-catalytiques (- - - -) ou à la 2-ThioU-ATCase (——).

b) Différences calculées entre les deux spectres de différence d'absorption de la figure a.


Sous - unités
2 - Thio U - Catalytiques
2 - Thio U - ATCase
a
Δε [M⁻¹ cm⁻¹]
λ (nm)
(2 - Thio U - ATCase) - (Sous - unités 2 - Thio U - Catalytiques)
b
Δ (Δε) [M⁻¹ cm⁻¹]
279
287
λ (nm)

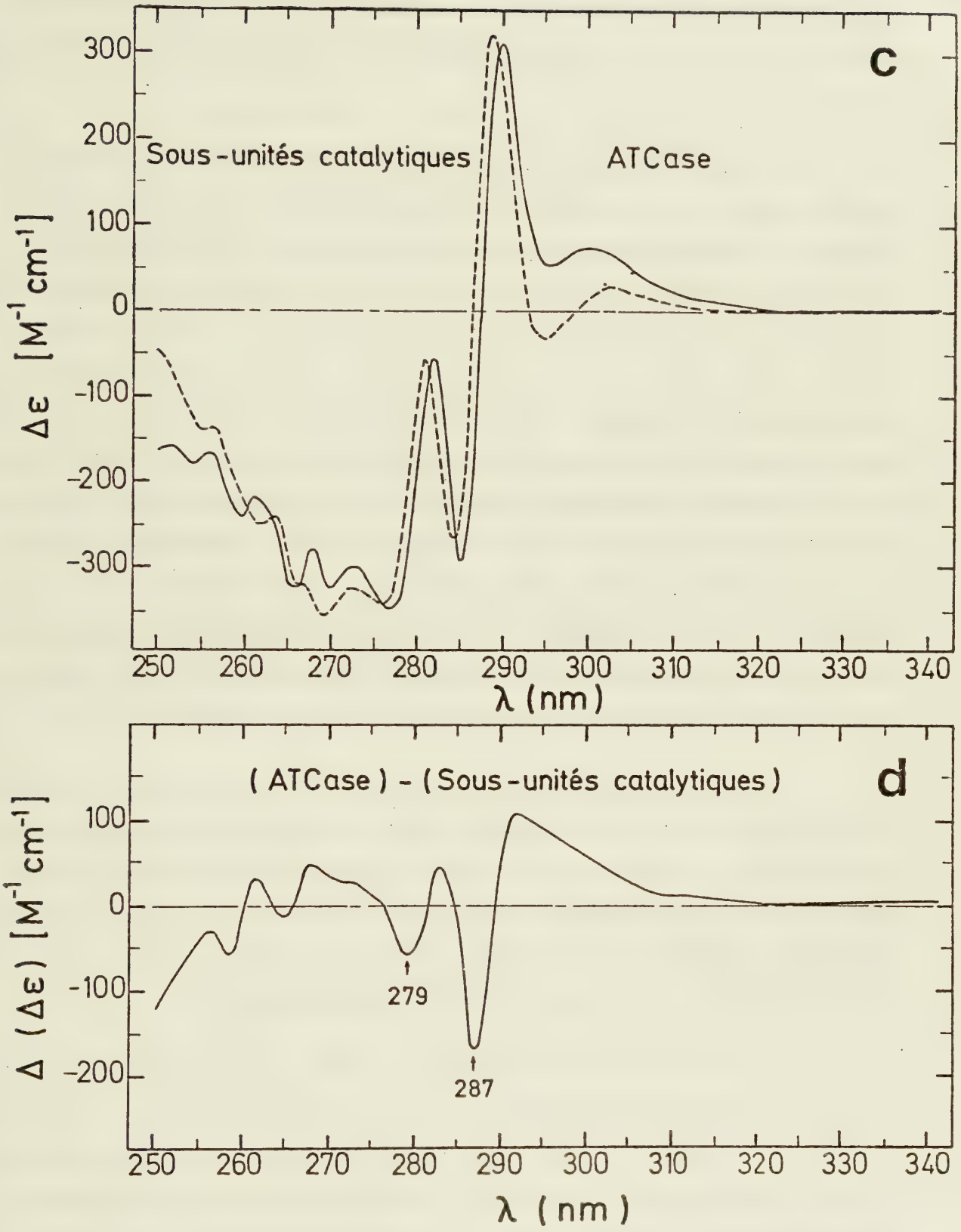
FIGURES 25 c et d

Spectres de différence d'absorption de l'ATCase et des sous-unités catalytiques produits par le PALA.

Les spectres de différence ont été obtenus dans les conditions décrites dans "Méthodes en présence de concentrations saturantes de PALA. Les différences d'absorption sont exprimées par mole de chaînes catalytiques C ou par mole de protomères $R\overset{\frown}{C}$. Les poids moléculaires de 33 000 et 50 000 daltons ont été respectivement utilisés.

c) Spectres de différence d'absorption observés dus à la liaison du PALA aux sous-unités catalytiques normales (- - - -) ou à l'ATCase (———).

d) Différences calculées entre les deux spectres de différence d'absorption de la figure c.


c
Sous-unités catalytiques
ATCase
Δε [M⁻¹cm⁻¹]
300
200
100
0
-100
-200
-300
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340
λ (nm)
d
(ATCase) - (Sous-unités catalytiques)
Δ (Δε) [M⁻¹cm⁻¹]
100
0
-100
-200
279
287
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340
λ (nm)

qualitativement similaires lorsque le PALA sature les deux espèces d'enzymes, les longueurs d'onde maxima étant de 282 nm et 290 nm et les minima de 285,25 nm et 296 nm. Il existe à nouveau entre ces spectres une différence quantitative d'amplitude de 35 %.

Les interactions homotropes coopératives entre sites catalytiques ne se produisent pas dans les sous-unités catalytiques isolées, au contraire de l'ATCase. Puisque le PALA induit les changements conformationnels liés à ces interactions (Chapitre I, paragraphe 1.3.2), il était intéressant de comparer les spectres de différence d'absorption dus respectivement à la liaison du PALA à ces deux types de protéines. Cette comparaison pourrait éventuellement permettre d'observer dans l'ATCase native un changement conformationnel supplémentaire à celui des sous-unités qui serait lié à l'existence d'interactions homotropes coopératives entre sites catalytiques. La figure 25.d indique la différence entre les deux spectres de différence d'absorption dus à la liaison du PA LA à l'ATCase et aux sous-unités catalytiques. Ce spectre de différence calculé présente les maxima négatifs à 279 nm et 287 nm caractéristiques d'un spectre d'absorption de résidus tyrosines déplacé vers les faibles longueurs d'onde ("vers le bleu"), et aux plus faibles longueurs d'onde, les perturbations caractéristiques de spectres d'absorption de résidus phénylalanines.

Ce résultat suggère que la liaison du PALA induit dans l'ATCase native mais non dans les sous-unités catalytiques isolées une modification conformationnelle qui correspond à l'exposition au milieu aqueux de résidus tyrosyls. Ce changement d'environnement, autour de résidus tyrosyls et phénylalanines qui peuvent appartenir aux chaînes catalytiques, ou régulatrices, ou aux deux types de chaînes, peut donc être lié à l'existence des interactions homotropes coopératives.

Puisque la 2-ThioU-ATCase ne manifeste pas les interactions homotropes coopératives entre les sites catalytiques, il était intéressant de regarder si la liaison du PALA à cette molécule provoque ces perturbations dans l'environnement de résidus tyrosyls et phénylalanyls. La figure 25.b montre qu'entre les spectres de différence d'absorption dus à la liaison du PALA à la 2-ThioU-ATCase et aux sous-unités

2-ThioU-catalytiques existe une différence qui correspond à un spectre de perturbation de résidus tyrosines et phénylalanines qualitativement analogue à celui observé figure 25.d dans le cas des espèces enzymatiques normales.

Des expériences de contrôle ont montré que lorsque le PALA est ajouté à des solutions de sous-unités régulatrices normales ou 2-ThioU-modifiées à raison de 1,5 mole de PALA par mole de chaîne régulatrice, aucune perturbation génératrice d'un spectre de différence d'absorption n'a été observée entre 250 nm et 350 nm.

Ainsi l'association aux sous-unités catalytiques des sous-unités régulatrices introduit dans la 2-ThioU-ATCase, au même titre que dans l'ATCase, des contraintes qui diminuent au cours de la fixation des substrats aux sites actifs, ce qui se manifeste par des changements d'environnement autour de résidus phénylalanines et tyrosines. Puisqu'ils se manifestent dans la 2-ThioU-ATCase, les changements conformationnels dus à la liaison des substrats observés à l'aide des méthodes ici décrites ne sont donc pas suffisants à expliquer les effets homotropes coopératif, bien que ces deux phénomènes puissent être liés dans l'ATCase normale.

5 - ETUDE DE LA NATURE CHIMIQUE DE LA MODIFICATION PROVOQUEE PAR LE 2-THIOURACILE

L'étude des propriétés catalytiques et régulatrices de la 2-ThioU-ATCase et de ses sous-unités qui a fait l'objet des précédents chapitres a montré que le comportement de cet enzyme résulte d'au moins deux types de modifications :

a) une modification des sous-unités régulatrices responsable de la perte des interactions homotropes positives entre les sites catalytiques ;

b) une modification des sous-unités catalytiques responsable de la diminution de leur activité spécifique.

Ces modifications sont observées sur un enzyme biosynthétisé en présence de 500 µg par ml de 2-thiouracile. Néanmoins, la présence de ce métabolite au cours de la biosynthèse de l'ATCase est-elle nécessaire pour modifier l'enzyme ? Dans le cas contraire, la simple incubation "in vivo" ou "in vitro" de l'ATCase en présence de 2-thouracile pourrait conduire à l'obtention d'un enzyme en tous points analogue à la 2-ThioU-ATCase.

5.1 - Le 2-Thiouracile Doit Etre Présent au Cours de la Biosynthèse de l'ATCase pour que l'Enzyme soit Modifié

L'influence du 2-thiouracile sur les propriétés de l'ATCase normale purif ou intracellulaire a été examinée. Il résulte de cette étude, exposée ci-dessous, que le 2-thiouracile doit être présent au cours de sa biosynthèse pour que l'ATCase soit modifiée.

5.1.1 - Le 2-thiouracile n'interfère pas "in vitro" avec les propriétés de l'ATCase normale purifiée

Des contrôles ont été effectués afin de vérifier que le 2-thiouracile ne modifie pas directement les propriétés de l'ATCase normale native.

5.1.1.1 - Le 2-thiouracile n'est pas inhibiteur de l'activité de l'ATCase

L'activité de l'ATCase a été déterminée dans les conditions standards décrites dans "Méthodes" en présence de concentrations croissantes de 2-thiouracile, jusqu'à la concentration de 10^{-2} M. Aucune inhibition n'a été observée. Ces résultats indiquent que le 2-thiouracile n'agit, ni comme inhibiteur non spécifique de l'ATCase, ni somme analogue du CTP pour la rétroinhibition.

Il a toutefois été montré que le 2-thio-UMP inhibe l'activité de l'ATCase / 79 /.

5.1.1.2 - Le 2-thiouracile n'inhibe pas compétitivement la rétroinhibition de l'ATCase par le CTP

La rétroinhibition par le CTP de l'ATCase normale purifiée a été étudié selon les conditions décrites dans "Méthodes" en présence de concentrations croissantes de 2-thiouracile, jusqu'à la concentration de 10^{-2} M.

Aucune variation du pourcentage d'inhibition par le CTP n'a été observée.

5.1.2 - La préincubation en présence de 2-thiouracile, "in vitro", ne modifie pas les propriétés de l'ATCase purifiée

Dans le but de déterminer une éventuelle modification chimique directe de l'enzyme par le 2-thiouracile, l'ATCase purifiée a été préincubée en présence de ce métabolite. Les sous-unités catalytiques et régulatrices ont en outre été recombinées en présence de 2-thiouracile. Les propriétés des enzymes ainsi traitées ont été comparées à celles de l'ATCase.

5.1.2.1 - Préincubation de l'ATCase native en présence de 2-thiouracile

Deux échantillons de 10 µg/ml d'ATCase dans le milieu minimum utilisé pour la dérépression du mutant ont été préincubés 6 heures en présence et en absence de 500 µg par ml de 2-thiouracile. Des prélèvements de 50 µl ont été effectués et testés pour la dépendance de l'activité vis-à-vis du pH et pour la rétroinhibition par le CTP. Les résultats, présentés Tableau XIII, montrent que durant les 6 heures de préincubation, le 2-thiouracile ne modifie pas ces propriétés de l'ATCase. L'activité spécifique de l'enzyme n'est pas affectée dans ces conditions.

5.1.2.2 - Dissociation et réassociation de l'ATCase en présence de 2-thiouracile

L'ATCase a été dissociée par le PHMB en sous-unités catalytiques et sous-unités régulatrices. Après séparation, 0,5 mg de chaque espèce de sous-unités ont été mélangés dans des conditions favorables à la recombinaison en présence de 500 µg par ml de 2-thiouracile. Comme le montrent les résultats indiqués dans le Tableau XIV, aucune différence supérieure aux écarts expérimentaux ne peut être détectée entre les propriétés de l'ATCase recombinée en présence de 2-thiouracile et l'enzyme témoin recombinée en absence de ce métabolite. Les courbes de saturation par l'aspartate de ces enzymes sont aussi identiques.

TABLEAU XIII

Propriétés de l'ATCase normale préincubée avec le 2-thiouracile

Deux solutions de 10 μg/ml d'ATCase dans le milieu minimum utilisé pour la déré-pression du mutant ont été préincubées 6 heures avec et sans 500 μg par ml de 2-thiouracile respectivement. Des échantillons de 50 μl ont été prélevés et testés pour la dépendance de leur activité ATCase vis-à-vis du pH et pour l'inhibition par le CTP dans les conditions décrites dans "Méthodes". Le CTP a été utilisé à 2 mM.

TABLEAU XIII

Propriétés de l'ATCase normale préincubée avec le 2-thiouracile

	ATCase seule		ATCase + 2-thiouracile	
Temps (heures)	0	6	0	6
Inhibition par CTP (%)	75	76	73	73
Rapport des activités pH 7 : pH 8,4	6,1	5,9	5,7	5,1

TABLEAU XIV

Propriétés de l'ATCase normale dissociée et réassociée en présence de 2-thiouracile

0,5 mg de sous-unités régulatrices et 0,5 mg de sous-unités catalytiques ont été mélangées dans un tampon phosphate de potassium 0,04 M, pH 7,0, contenant du β-mercaptoéthanol 2 mM, et de l'acétate de zinc 0,04 mM, et en présence ou en absence de 500 μg par ml de 2-thiouracile. Ces solutions, dont le volume total était de 0,35 ml, ont été incubées 30 minutes à 37°C. 0,44 μg de chacun des enzymes recombinés a été prélevé pour l'étude des rapports d'activités aux pH 7 et pH 8,4 et du pourcentage d'inhibition par le CTP 1 mM.

La dissociation en chaînes protéiques de l'AT Case a été réalisée par dialyse de 0,5 ml d'enzyme à 2 mg/ml contre 50 ml de tampon Tris-acétate 0,1 M, pH 8, contenant du chlorure de guanidine 6 M, et 500 μg/ml de 2-thiouracile. Après 24 heures, l'échantillon a été dialysé pour la réassociation des chaînes contre 1 litre de tampon Tris-acétate 0,1 M, pH 8 contenant de l'acétate de zinc 0,5 mM et 500 μg/ml de 2-thouracile. L'échantillon témoin a été traité de la même manière mais en l'absence de 2-thouracile. Les deux solutions ont été ensuite dialysées deux jours contre un litre de tampon Tris-acétate 0,01 M, pH 8, contenant du β-mercaptoéthanol 10^{-2}

TABLEAU XIV

Propriétés de l'ATCase normale dissociée et réassociée en présence de 2-thiouracile

Conditions de dissociation et réassociation	Rapport des activités pH 7 : pH 8,4	% Inhibition par CTP
S.U. Cat. + S.U. Reg.	1,85	48 %
S.U. Cat. + S.U. Reg. + 2-thiouracile	2,42	40 %
Chaînes Cat. + Chaînes Reg.	1,9	48 %
Chaînes Cat. + Chaînes Reg. + 2-thiouracile	2,5	45 %

Dans le but de dissocier l'ATCase en chaînes catalytiques et chaînes régulatrices, une solution de 2mg par ml d'enzyme a été incubée 24 heures, à pH 8, dans un milieu dénaturant contenant du chlorure de guanidine 6 M, en présence de 500 µg par ml de 2-thiouracile et en absence de zinc et de β -mercaptoéthanol. Après réassociation en présence de zinc et de 2-thiouracile, mais en absence de β -mercaptoéthanol, les propriétés de l'ATCase ont été analysées. Les résultats qui sont indiqués sur le Tableau XIV, n'ont montré aucune différence supérieure aux écarts expérimentaux entre les propriétés de cet enzyme et celles de l'enzyme traité dans les mêmes conditions mais sans 2-thiouracile. Les courbes de saturation par l'aspartate de ces deux échantillons enzymatiques sont aussi identiques.

Ces résultats permettent d'éliminer l'hypothèse selon laquelle le 2-thiouracile pourrait modifier l'ATCase par simple réaction chimique avec les résidus des chaînes protéiques. Le fait que les propriétés de l'enzyme dénaturée puis renaturée en présence de 2-thiouracile soient également normales, permet en outre d'éliminer une autre hypothèse selon laquelle seuls les acides aminés exposés au milieu avant que l'enzyme n'ait acquis sa structure quaternaire seraient susceptibles d'être modifiés.

Cependant, une telle modification directe des chaînes protéiques sous l'influence du 2-thiouracile pourrait avoir lieu sur l'ATCase normale, "in vivo", dans la cellule, grâce à la présence de certains enzymes par exemple, ou plus simplement à cause de l'existence d'une force ionique, d'un pH, d'une concentration en 2-thiouracile favorables à la réaction.

Dans le but d'analyser cette hypothèse, et de déterminer si la modificati a lieu au cours de la biosynthèse, ou après celle-ci, l'expérience décrite ci-dessous a été réalisée.

5.1.3 - L'incubation en présence de 2-thiouracile ne modifie pas "in vivo" les propriétés de l'ATCase intracellulaire

25 ml (7×10^7 bactéries par ml) de suspension du mutant (auxotrophe vis-à-vis de l'uracile et de l'histidine) cultivé dans les conditions de répression ont été filtrés sur filtre Millipore stérile (diamètre 45 mm, taille des pores 1,2 µm), et les cellules ont été jetées dans 25 ml du milieu standard décrit dans "Méthodes", contenant de l'histidine mais dépourvu d'uracile. Après 4 heures d'incubation à 37°C dans ces conditions de dérépression pour la synthèse de l'ATCase, l'activité spécifique de l'enzyme s'élève à 670 unités par mg de protéines. Les bactéries ont été alors filtrées et jetées dans un milieu "standard" sans uracile, dépourvu en outre d'histidine afin de bloquer toute nouvelle synthèse "de novo" de l'ATCase, et contenant 500 µg de 2-thiouracile par ml. Les bactéries ont alors été réincubées durant 5 heures dans ce milieu à 37°C afin d'observer une éventuelle modification par le 2-thiouracile de l'ATCase normale synthétisée au cours de la première phase de l'expérience. Avant et après cette exposition au 2-thiouracile, des échantillons ont été prélevés et les cellules ont été soniquées dans les conditions décrites dans "Méthodes" dans le but d'analyser l'activité et les propriétés de l'ATCase.

Après l'exposition au 2-thiouracile, l'activité spécifique de l'ATCase dans l'extrait cellulaire était de 630 unités par mg de protéines. Ce résultat montre qu'aucune biosynthèse d'ATCase n'était survenue au cours de l'incubation en absence d'histidine. Les propriétés de l'ATCase présente dans les extraits cellulaires avant et après l'exposition "in vivo" au 2-thiouracile sont indiquées dans le Tableau XV et sur la figure 26 où elles sont comparées à celles de l'enzyme obtenu lorsque le 2-thiouracile est ajouté au milieu de culture dès le début de la dérépression.

Ces résultats démontrent que, selon les critères du pH optimum d'activité, de l'inhibition par le CTP, et de l'existence des interactions homotropes, seuls les extraits de cellules qui ont été incubées en présence du 2-thiouracile dès le début de la dérépression, contiennent une ATCase modifiée.

TABLEAU XV

Etude de l'influence du 2-thiouracile sur les propriétés de l'ATCase intracellulaire

Une culture de 25 ml du mutant auxotrophe pour l'uracile et l'histidine a été soumise aux conditions de dérépression pendant 4 heures. Un échantillon a été prélevé, soniqué, et l'extrait analysé pour les propriétés en ATCase (a). La suspension principale restante a été filtrée et resuspendue dans un milieu dépourvu en uracile et en histidine (afin d'empêcher toute nouvelle synthèse d'ATCase) mais en présence de 500 μg par ml de 2-thiouracile. Après réincubation pendant 5 heures à 37°C, les cellules ont été soniquées et analysées pour l'activité ATCase (b). Pour l'expérience contrôle, le 2-thiouracile a été ajouté dès le début de la dérépression (c).

Des aliquotes des extraits cellulaires ont été testés dans les conditions décrites dans "Méthodes" vis-à-vis du rapport des activités aux pH 7 et pH 8,4, et du pourcentage d'inhibition par le CTP 0,5 mM.

TABLEAU XV

Etude de l'influence du 2-thiouracile sur les propriétés de l'ATCase intracellulaire

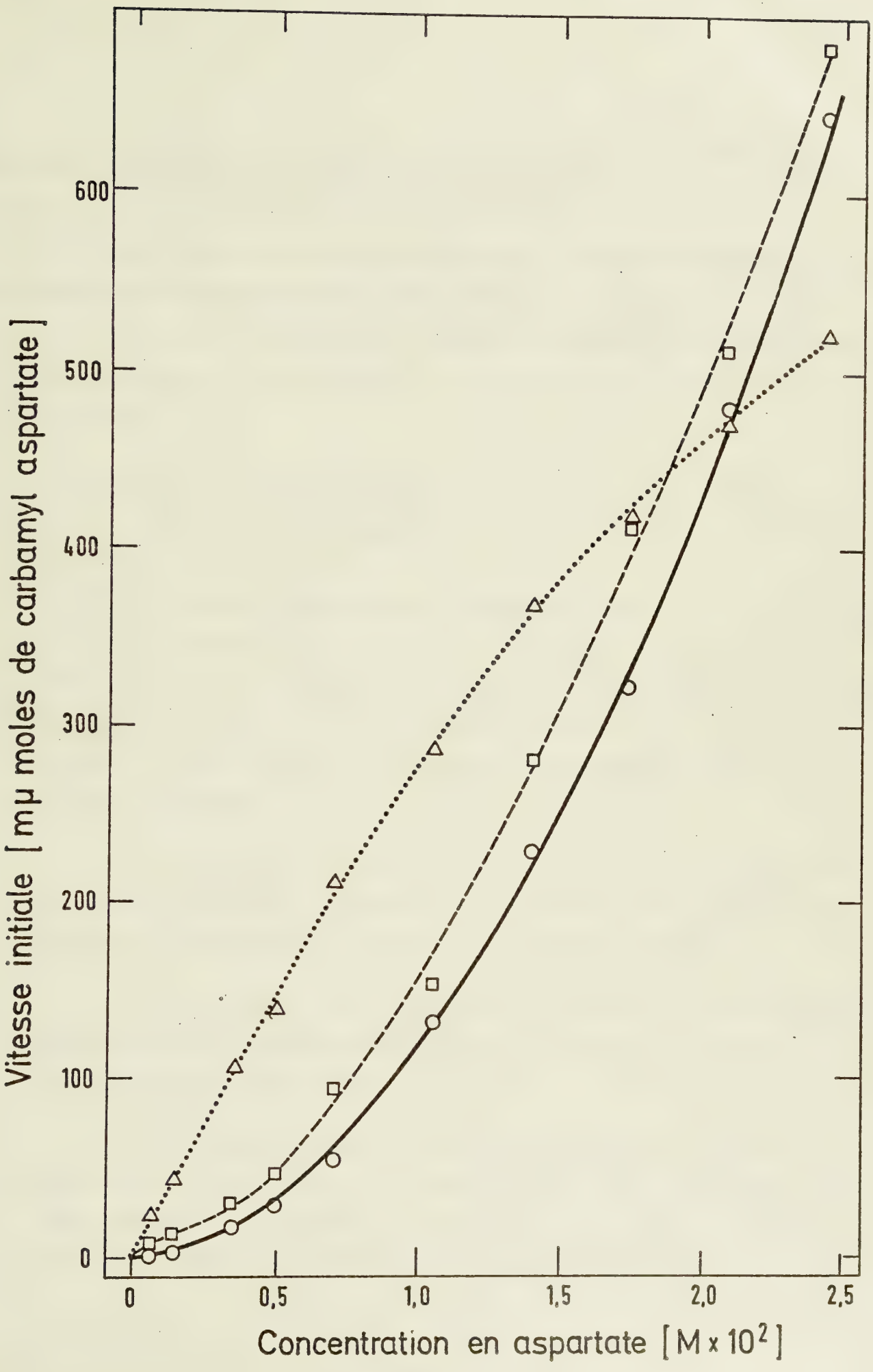
	Extraits cellulaires analysés		
	(a) Avant l'addition du 2-thiouracile	(b) Après l'addition du 2-thouracile et réincubation	(c) 2-thouracile ajouté au début de la dérépression
Inhibition par CTP (%)	49	50	22
Rapport d'activité pH 7 : pH 8,4	5,6	4,2	0,73

FIGURE 26

Etude de l'existence des interactions coopératives dans l'ATCase intracellulaire biosynthétisée avant ou après l'exposition au 2-thiouracile.

Les extraits cellulaires de bactéries déréprimées pour la synthèse de l'ATCase dans les conditions (a), (b), (c), décrites Tableau XV ont été analysés pour l'existence des interactions homotropes coopératives dans les conditions décrites figure 6.

(- o - o -), condition (a), avant l'addition du 2-thiouracile ; (- □ - □ -), condition (b), après addition du 2-thiouracile et réincubation dans un milieu dépourvu d'histidine ; (- Δ - Δ -), condition (c), 2-thiouracile présent dès le début de la dérépression.


Vitesse initiale [mμ moles de carbamyl aspartate]
600
500
400
300
200
100
0
0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
Concentration en aspartate [M x 10²]

L'ensemble de ces expériences montre que la modification de l'ATCase par le 2-thiouracile se produit exclusivement si celui-ci est présent au cours de la biosynthèse de l'enzyme. Il était alors intéressant, dans le but de comprendre le processus selon lequel le 2-thiouracile agit, de déterminer quelle est sa concentration nécessaire et suffisante pour l'obtention de la 2-ThioU-ATCase.

5.2 - L'Influence du 2-Thiouracile sur le Taux de Synthèse et les Propriétés de l'ATCase Dépend de sa Concentration dans le Milieu de Dérépression

Dans le but de déterminer qu'elle est dans le milieu de dérépression la concentration minimale en 2-thiouracile nécessaire à la modification de l'ATCase, les bactéries ont été cultivées dans les conditions de dérépression en présence de concentrations croissantes en 2-thiouracile. Les propriétés de l'ATCase ont alors été analysées.

5.2.1 - Le taux de dérépression pour l'ATCase diminue lorsque la concentration en 2-thiouracile augmente

Dans le but de déterminer l'influence de la concentration en 2-thiouracile sur l'activité maximale en ATCase obtenue en exposant les cellules aux conditions de dérépression, le mutant auxotrophe pour l'uracile a été cultivé, dans les conditions de dérépression décrites dans "Méthodes", dans des échantillons de 10 ml de milieu, contenant 4 µg d'uracile/ml, et des concentrations croissantes de 2-thiouracile (de 50 µg/ml à 1 mg/ml).

Les cellules ont été incubées 7 heures dans ces conditions, et les extraits cellulaires ont été préparés par sonication des bactéries de la manière décrite dans "Méthodes". L'activité en ATCase des extraits a alors été déterminée.

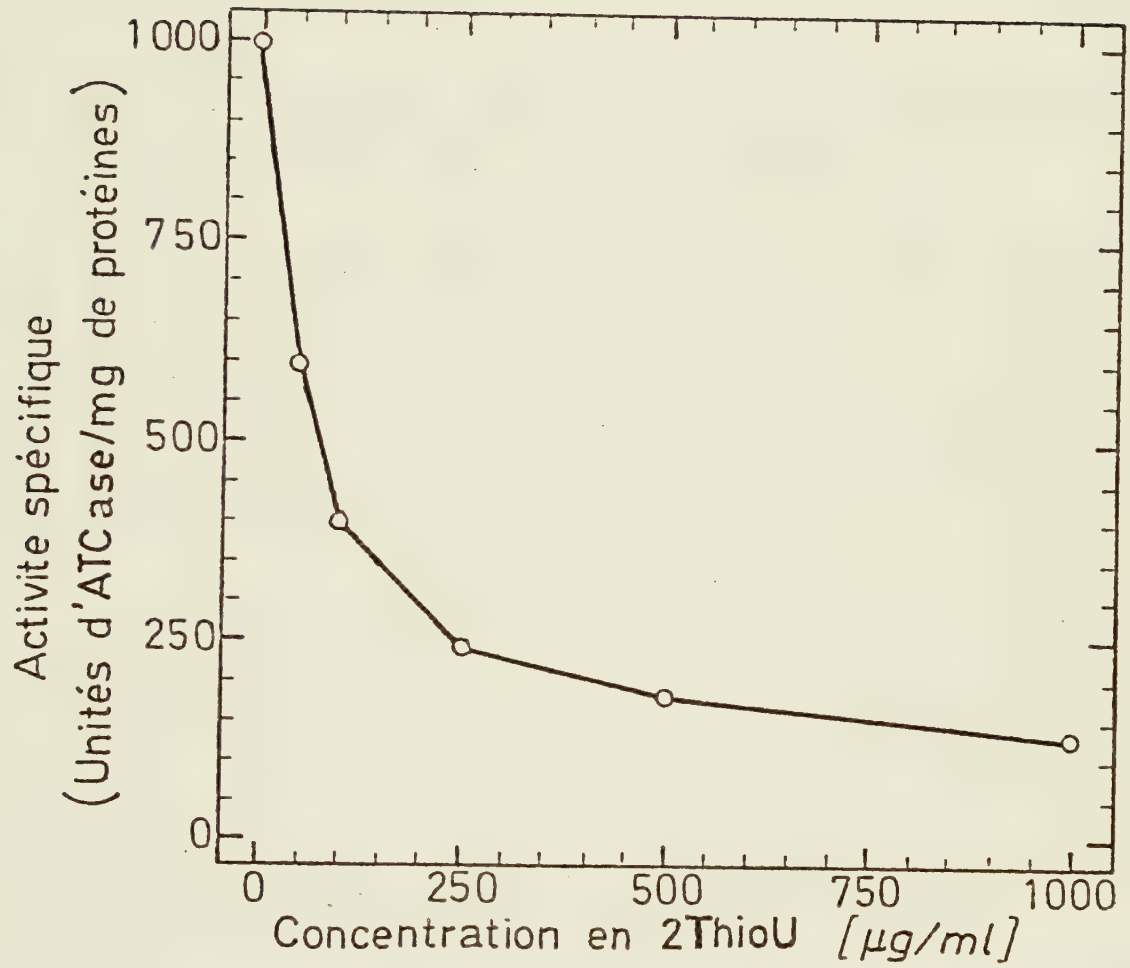
Les résultats, présentés figure 27, indiquent que l'activité spécifique en ATCase des extraits de bactéries déréprimées décroît lorsque la concentration en 2-thiouracile dans le milieu augmente.

La valeur de l'activité spécifique de l'extrait obtenu en présence de 500 µg/ml de 2-thiouracile est intéressante. En effet, l'activité spécifique est, pour cette concentration en 2-thiouracile, diminuée de 80 % par rapport à la normale. Ceci révèle que le 2-thiouracile affecte non seulement l'activité de l'enzyme, qui est dans

FIGURE 27

Effet de la concentration en 2-thiouracile sur l'activité en aspartate transcarbamylase des cellules déréprimées.

Les cultures (10 ml) du mutant ont été déréprimées en présence de quantités croissantes de 2-thiouracile. L'activité en ATCase des extraits a été déterminée dans les conditions standards (voir "Méthodes"). Les concentrations en protéines ont été mesurées selon la méthode de LOWRY, ROSEBROUGH, FARR et RANDALL / 38 /.


Activité spécifique
(Unités d'ATCase/mg de protéines)
1000
750
500
250
0
0
250
500
750
1000
Concentration en 2ThioU [µg/ml]

ces conditions de 50 % inférieure à celle de l'ATCase (Chapitre 3 , paragraphe 3.1.2.1 de cette thèse), mais aussi la quantité d'enzyme synthétisé.

Il a été vérifié qu'en présence d'uracile (30 µg/ml) de grandes concentrations en 2-thiouracile (500 µg/ml) n'affectent pas la croissance du mutant (figure 28), ainsi que l'a observé CARDEILHAC / 24 / dans d'autres conditions.

5.2.2 - Les propriétés de l'ATCase synthétisée dépendent de la concentration en 2-thiouracile présente dans le milieu de dérépression

La 2-ThioU-ATCase, précédemment étudiée, était un enzyme synthétisé en présence de 500 µg par ml de 2-thiouracile (4×10^{-3} M) dans le milieu de dérépression. Il était intéressant de regarder si des concentrations beaucoup plus faibles en 2-thiouracile pouvaient conduire de la même façon à la synthèse de la 2-ThioU-ATCase ou éventuellement à la synthèse d'un enzyme partiellement modifié, présentant seulement certaines des caractéristiques de la 2-ThioU-ATCase.

Dans ce but, les bactéries ont été soumises aux conditions de dérépression pour la biosynthèse de l'ATCase, en présence de concentrations croissantes en 2-thiouracile, de 4×10^{-5} M (5 µg/ml) à 4×10^{-3} M (500 µg/ml). Les enzymes synthétisés dans ces conditions ont été étudiés vis-à-vis des critères qui différencient la 2-ThioU-ATCase de l'ATCase. Les résultats, indiqués Tableau XVI, montrent que des concentrations cent fois plus faibles (4×10^{-5} M) que celles utilisée pour la synthèse de la 2-ThioU-ATCase (4×10^{-3} M) sont pratiquement suffisantes pour provoquer un abaissement du rapport des activités à pH 7 et pH 8,4, et une diminution de la sensibilité au CTP. Toutefois, lorsque la concentration en 2-thiouracile décroît de 4×10^{-4} à 4×10^{-5} M, ces paramètres évoluent légèrement vers ceux de l'enzyme normal.

Sur la figure 29 sont représentées les courbes de saturation par l'aspartate des différents extraits. Ces courbes de saturation demeurent sigmoïdes jusqu'à ce que

FIGURE 28

Croissance du mutant en absence et en présence de 2-thiouracile.

Le mutant auxotrophe pour l'uracile a été cultivé à 37°C en milieu de croissance standard décrit dans "Méthodes" contenant 30 µg d'uracile par ml et en présence (- ● - ● -) ou absence (- o - o -) de 2-thiouracile (500 µg/ml). La croissance a été mesurée en suivant la densité optique à 546 nm au spectrophotomètre Eppendorf.

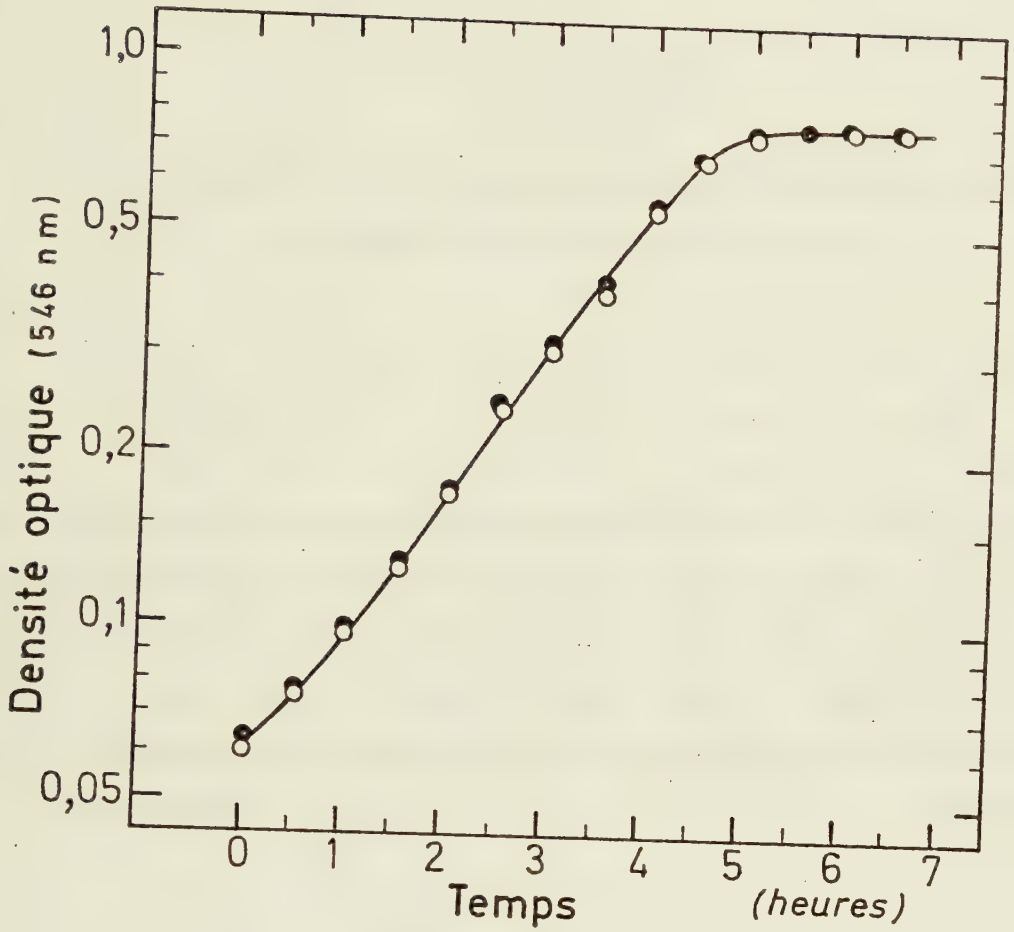

1,0
0,5
0,2
0,1
0,05
Densité optique (546 nm)
0
1
2
3
4
5
6
7
Temps
(heures)

TABLEAU XVI

Propriétés de l'ATCase obtenue après dérépression en présence de concentrations croissantes de 2-thiouracile

Des aliquotes d'extraits cellulaires contenant approximativement les quantités d'enzyme nécessaires à une activité en présence d'aspartate 20 mM équivalente à celle de 0,13 μg d'ATCase purifiée, ont été incubés dans les conditions standards pour l'étude des activités spécifiques. Les rapports d'activités aux pH 7 et pH 8,4, ainsi que les pourcentages d'inhibition par le CTP ont été déterminés dans les conditions décrites dans "Méthodes".

TABLEAU XVI

Propriétés de l'ATCase obtenue après dérépression en présence de concentrations croissantes de 2-thiouracile

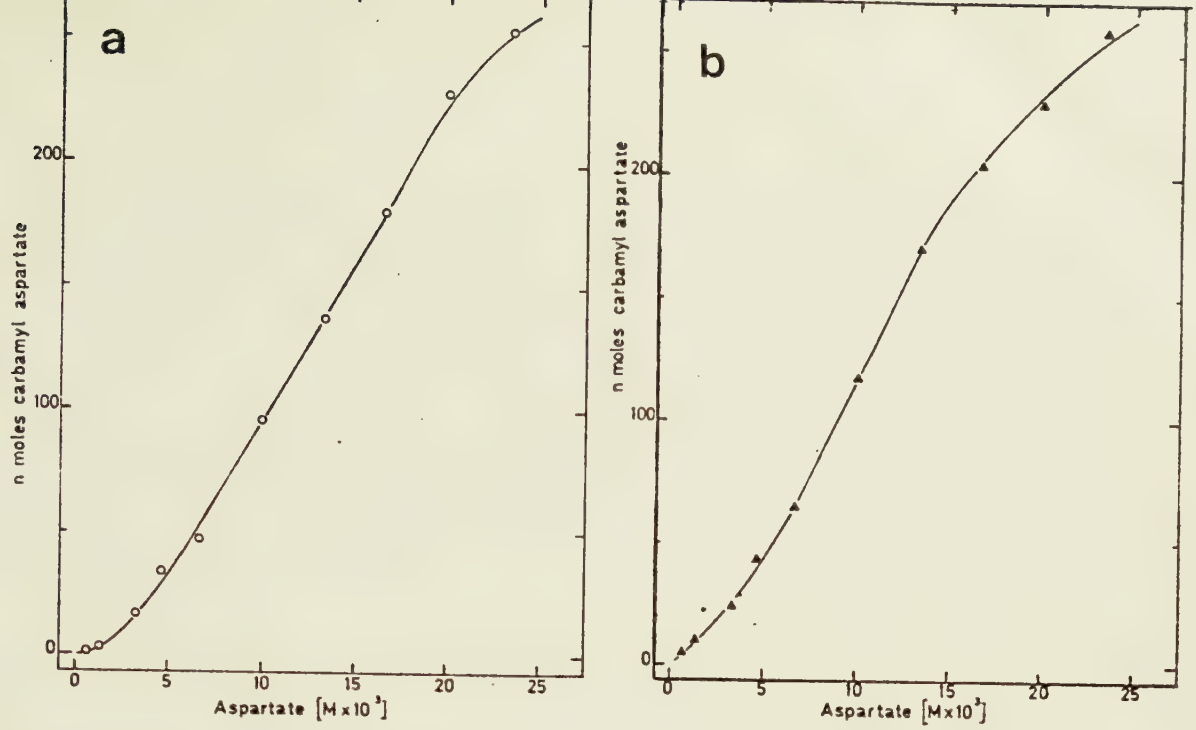
Conditions de dérépression	Activités spécifiques	Rapport d'activités pH 7 : pH 8,4	% Inhibition par CTP 10^{-3} M
Normales	870	4,73	62,5
+ 2-thiouracile 4×10^{-5} M	705	1,83	45,5
+ 2-thiouracile $1,6 \times 10^{-4}$ M	396	1,45	43,5
+ 2-thiouracile 4×10^{-4} M	247	1,48	37
+ 2-thiouracile 2×10^{-3} M	62	1,04	34
+ 2-thiouracile 4×10^{-3} M	44	1,04	37

FIGURE 29

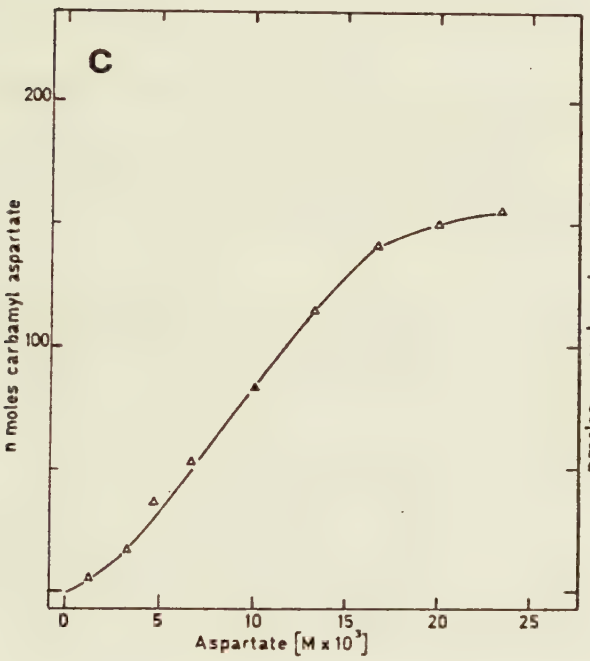
Courbes de saturation par l'aspartate des extraits de cellules déréprimées en présence de concentrations croissantes de 2-thiouracile.

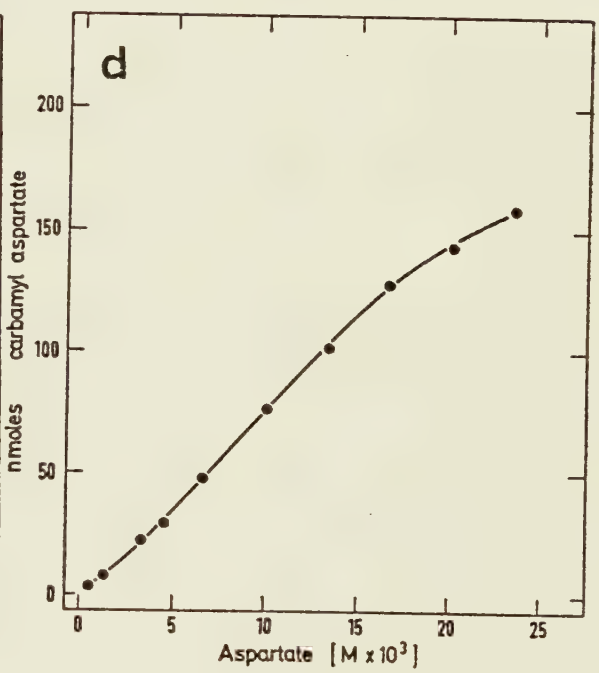
Les quantités décrites Tableau XVI d'extraits cellulaires de bactéries déréprimées en présence de 4×10^{-5} M à 4×10^{-3} M de 2-thiouracile ont été utilisées pour l'étude des vitesses initiales en présence de concentrations croissantes d'aspartate de 0,7 mM à 25 mM.

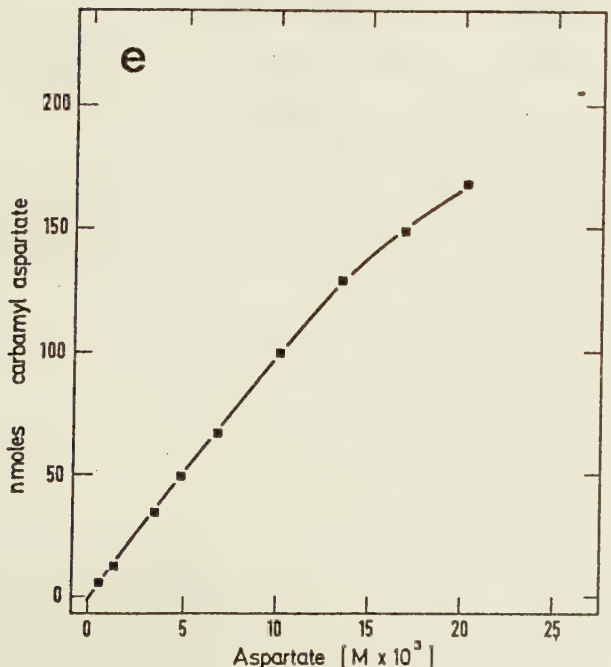
a) Conditions normales de dérépression.
b) Dérépression en présence de 2-thiouracile 4×10^{-5} M.
c) Dérépression en présence de 2-thiouracile $1,6 \times 10^{-4}$ M.
d) Dérépression en présence de 2-thiouracile 4×10^{-4} M.
e) Dérépression en présence de 2-thiouracile $1,6 \times 10^{-3}$ M.
f) Dérépression en présence de 2-thiouracile 4×10^{-3} M.

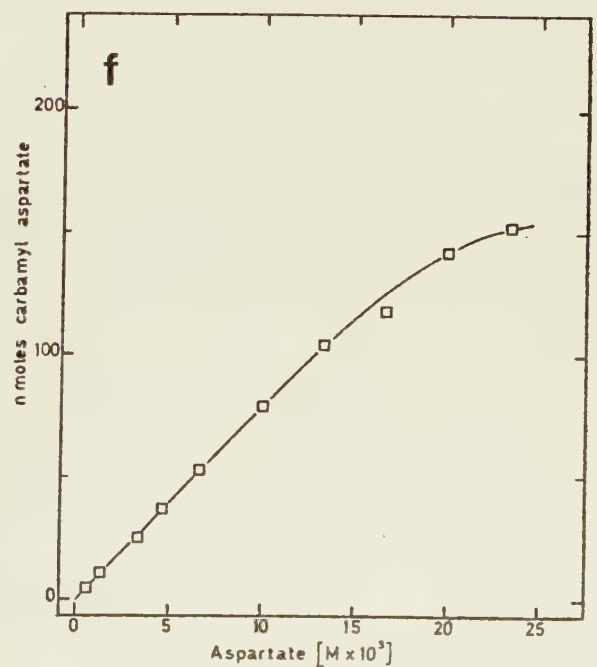

a
n moles carbamyl aspartate
0
100
200
0 5 10 15 20 25
Aspartate [M x 10³]

b
n moles carbamyl aspartate
0
100
200
0 5 10 15 20 25
Aspartate [M x 10³]


c
n moles carbamyl aspartate
100
200
0 5 10 15 20 25
Aspartate [M x 10³]


d
n moles carbamyl aspartate
0
50
100
150
200
0 5 10 15 20 25
Aspartate [M x 10³]


e
n moles carbamyl aspartate
0
50
100
150
200
0 5 10 15 20 25
Aspartate [M x 10³]


f
n moles carbamyl aspartate
0
100
200
0 5 10 15 20 25
Aspartate [M x 10³]

le 2-thiouracile soit présent à la concentration de 4×10^{-4} M. De même que les valeurs des rapports d'activités aux pH 7 et pH 8,4 et les pourcentages d'inhibition par le CTP évoluaient progressivement entre l'enzyme témoin et celui synthétisé en présence de 2-thiouracile 4×10^{-4} M (Tableau XVI), de même la sigmoïdicité des courbes diminue progressivement. Ce résultat souligne le parallélisme (déjà évoqué Chapitre I) entre l'existence de la coopérativité pour la fixation de l'aspartate et la valeur du pH optimum d'activité.

Le 2-thiouracile modifie donc les chaînes catalytiques et les chaînes régulatrices de l'ATCase, au cours de la biosynthèse de l'enzyme et dans des conditions de concentrations en 2-thiouracile très précises. Sur la nature chimique de ces modifications, au moins quatre hypothèses peuvent être faites :

a) Le 2-thiouracile, ou un métabolite synthétisé dans la cellule à partir de celui-ci pourrait réagir de façon covalente avec certains groupements de la protéine ;

b) Le 2-thiouracile pourrait agir en complexant le zinc, qui, associé aux sous-unités régulatrices / 12 , 13 / est essentiel à l'association des sous-unités catalytiques et régulatrices, et au maintien de la structure quaternaire de l'aspartate transcarbamylase / 8 , 11 /. La 2-ThioU-ATCase serait ainsi un enzyme déficient en zinc.

c) Le 2-thiouracile pourrait être légèrement incorporé dans l'AR N messager codant pour l'ATCase, et (ou) dans l'ARN de transfert. Ceci provoquerait de légères modifications de la structure primaire de l'enzyme.

d) Le 2-thiouracile pourrait agir directement ou indirectement durant le processus d'établissement de la structure tertiaire ou quaternaire de l'ATCase.

5.3 - Fonctions Chimiques du 2-thiouracile Essentielles à l'Obtention de la 2-ThioU-ATCase

Les différentes hypothèses évoquées ci-dessus ont conduit à examiner si la présence au cours de la dérépression de l'ATCase de molécules possédant l'une ou l'autre des fonctions chimiques caractéristiques du 2-thiouracile était susceptible de modifier spécifiquement l'enzyme de la même manière que ce métabolite.

5.3.1 - Parmi les molécules possédant un groupement sulfhydrile, seules les 2-thiopyrimidines modifient spécifiquement l'ATCase

Le 2-thiouracile ou un métabolite dérivé de ce composé pourrait modifier l'ATCase par réaction covalente entre sa fonction sulfhydrile et une fonction sulfhydrile de la protéine par formation de liaisons di-sulfures. Si tel est le cas, d'autres molécules possédant un groupement sulfhydrile pourraient, au cours de la biosynthèse de l'enzyme, réagir de façon identique au 2-thiouracile avec certaines fonctions réactives des chaînes protéiques telles que les groupements sulfhydriles des cystéines. L'ATCase contient 30 résidus cystéines qui se répartissent en quatre résidus par chaîne régulatrice et un résidu par chaîne catalytique, et qui sont toutes sous forme réduite.

Pour tester cette hypothèse, l'ATCase a été synthétisée dans les conditions standards de dérépression décrites dans "Méthodes", en présence respectivement de l'un des composés suivants : glutathion, cystéine, thiourée, 2-thiocytosine, 4-thiouracile.

La thiourée a été choisie en raison de l'analogie possible entre la dégradation de l'uracile en urée et la dégradation du 2-thiouracile en thiourée.

La 2-thiocytosine diffère du 2-thiouracile par la présence d'un groupement aminé en position 4, tandis que le 4-thiouracile diffère de ce dernier par la position du groupement sulfhydrile.

Ces différentes substances ont été utilisées à la même concentration que le 2-thiouracile, soit 4×10^{-3} M. L'activité spécifique en ATCase des extraits cellulaires a été déterminée, ainsi que les rapports d'activités aux pH 7 et pH 8,4, les pourcentages d'inhibition le CTP et la coopérativité vis-à-vis de l'aspartate.

Les résultats obtenus, qui sont indiqués dans le Tableau XVII et la figure 30 montrent que les enzymes synthétisés en présence de thiourée, de glutathion et de cystéine présentent toutes les caractéristiques de l'enzyme normal. Par contre, l'enzyme synthétisé en présence de 2-thiocytosine présente les caractères de la 2-ThioU-ATCase, tandis qu'en présence de 4-thiouracile, l'activité en ATCase des extraits est analogue à celle de l'extrait réprimé. Ce dernier résultat peut indiquer la synthèse d'un enzyme inactif, ou plus probablement, une absence de dérépression.

L'effet de concentrations croissantes en 2-thiocytosine sur les taux de dérépression et les propriétés de l'ATCase a également été examiné : L'activité spécifique en ATCase des extraits de cellules déréprimées décroît lorsque les concentrations en 2-thiocytosine augmentent de 4×10^{-5} M à 4×10^{-3} M, et ceci de la même manière que dans le cas du 2-thiouracile / 80 /. De façon analogue, les rapports des activités aux pH 7 et pH 8,4, ainsi que les pourcentages d'inhibition par le CTP évoluent vers les valeurs caractéristiques de la 2-ThioU-ATCase à mesure que les concentrations en 2-thiocytosine augmentent. Les effets homotropes coopératifs disparaissent progressivement jusqu'à être totalement abolis en présence de 4×10^{-3} M en 2-thiocytosine / 80 /.

Ainsi, parmi les métabolites étudiés, seules les 2-thiopyrimidines ont été capables de modifier spécifiquement l'ATCase.

La seule présence de la fonction sulfhydrile dans la molécule de 2-thiouracile n'est donc pas suffisante pour provoquer la synthèse de la 2-ThioU-ATCase. Il faut que cette fonction soit en position 2 du noyau pyrimidique pour que l'analogue de l'uracile modifie l'enzyme.

TABLEAU XVII

Propriétés de l'ATCase obtenue lors de la dérépression en présence de substances possédant un groupement sulfhydrile

Des aliquotes d'extraits cellulaires contenant approximativement les quantités d'enzyme nécessaires à une activité en présence d'aspartate 20 mM équivalente à celle de 0,13 μg d'ATCase purifiée, ont été incubés dans les conditions standards pour l'étude des activités spécifiques. Les rapports d'activités aux pH 7 et pH 8,4, ainsi que les pourcentages d'inhibition par le CTP ont été déterminés dans les conditions décrites dans "Méthodes".

TABLEAU XVII

Propriétés de l'ATCase obtenue lors de la dérépression en présence de substances possédant un groupement sulfhydrile

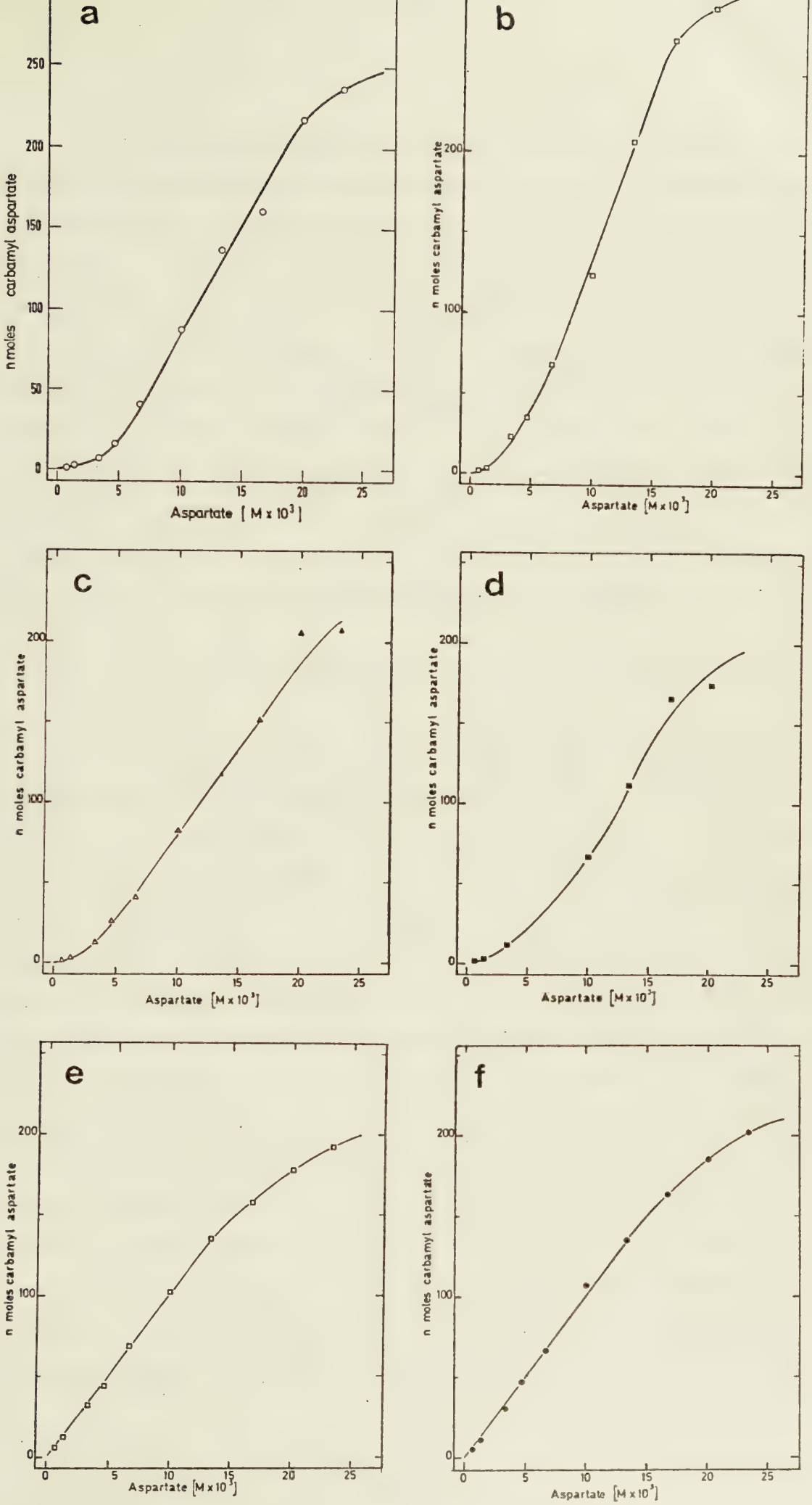
Conditions de dérépression	Activités spécifiques	Rapport d'activités pH 7 : pH 8,4	% Inhibition par CTP 10^{-3} M
Normales	1 470	3,7	61
+ glutathion 4×10^{-3} M	1 340	3,8	62
+ thiourée 4×10^{-3} M	1 045	3,1	58
+ cystéine 4×10^{-3} M	715	3,1	60
+ 2-thiouracile 4×10^{-3} M	62	1,2	40
+ 2-thiocytosine 4×10^{-3} M	66	1,2	39
+ 4-thiouracile 4×10^{-3} M	8	-	-
Répression + uracile $2,6 \times 10^{-4}$ M	6	-	-

FIGURE 30

Courbes de saturation par l'aspartate des extraits de cellules déréprimées en présence de molécules possédant une fonction sulfhydrile.

Les quantités décrites Tableau VII d'extraits cellulaires de bactéries déréprimées en présence de molécules possédant une fonction sulfhydrile, aux concentrations 4×10^{-3} M, ont été utilisées pour l'étude des vitesses initiales en présence de concentrations croissantes d'aspartate de 0,7 mM à 25 mM.

a) Conditions normales de dérépression.
b) Dérépression en présence de cystéine.
c) Dérépression en présence de glutathion.
d) Dérépression en présence de thiourée.
e) Dérépression en présence de 2-thiocytosine.
f) Dérépression en présence de 2-thiouracile.


a
b
c
d
e
f
n moles carbamyl aspartate
Aspartate [M x 10³]
0
50
100
150
200
250
5
10
15
20
25

Les propriétés particulières de la 2-ThioU-ATCase ne peuvent donc d'expliquer par la seule formation de ponts disulfures entre les cystéines des chaînes polypeptidiques et les analogues de l'uracile porteurs d'une fonction sulfhydrile. En outre, comme le confirme l'étude décrite plus loin, paragraphe 5.5.2, la 2-ThioU-ATCase possède un contenu normal en cystéines réduites. Néanmoins, les résultats précédents ne peuvent exclure que les 2-thiopyrimidines ou leurs dérivés seraient, par leur fonction sulfhydrile ou par une autre fonction, impliquées dans une liaison covalente avec certains résidus protéiques autres que les cystéines. Si tel était le cas, l'utilisation de 2-thiouracile radioactif dans le milieu de dérépression devrait conduire à l'obtention d'une 2-ThioU-ATCase radioactive. La synthèse de la 2-ThioU-ATCase en présence de $\left[2\text{-}C^{14}\right]$-2-thiouracile a été réalisée. Les résultats de cette expérience, décrite ci-dessous, ont conduit à éliminer cette hypothèse.

5.3.2 - Le $\left[2\text{-}C^{14}\right]$-2-thiouracile n'est pas incorporé dans la 2-ThioU-ATCase

La 2-ThioU-ATCase a été biosynthétisée dans 10 ml du milieu standard pour la dérépression (voir "Méthodes"), contenant en outre du $\left[2\text{-}C^{14}\right]$ -2-thiouracile (59 Ci/mole), en concentration (10^{-3} M) suffisante pour obtenir un enzyme ayant toutes les propriétés de l'enzyme modifié. Les bactéries ont été cultivées dans ces conditions durant 24 heures, puis 250 µl de suspension cellulaire ont été prélevés et traités au toluène 0,18 M. L'activité spécifique et les propriétés de la 2-ThioU-ATCase ont été ensuite étudiés sur les cellules ainsi perméabilisées. Sur le Tableau XVIII sont indiquées les propriétés de cet enzyme ainsi que celles des enzymes synthétisés dans les conditions normales ou en présence de 2-thiouracile 10^{-3} M, non radioactif. Ces résultats montrent que l'enzyme synthétisé en présence de $\left[2\text{-}C^{14}\right]$ -2-thiouracile se comporte comme la 2-ThioU-ATCase. Afin de mesurer son éventuelle radioactivité, cet enzyme a été purifié de la manière suivante : les bactéries soumises à la dérépression pour la synthèse de l'ATCase en présence de $\left[2\text{-}C^{14}\right]$ -2-thiouracile ont été recueillies, lavées deux fois dans 10 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 9,2, puis resuspendues dans 20 ml de ce même tampon, contenant en outre, comme "entraîneur", 75 mg de 2-ThioU-ATCase purifiée (dont la synthèse avait été réalisée en présence de 2-thiouracile 10^{-3} M).

TABLEAU XVIII

Propriétés de la 2-ThioU-ATCase synthétisée en présence de $\left[2\text{-}C^{14}\right]$ -2-thiouracile

Après 24 heures de dérépression dans les conditions normales ou en présence de 2-thiouracile, les bactéries ont été lavées et soniquées comme il est décrit dans "Méthodes" dans un tampon phosphate de potassium 0,01 M , pH 7,0, contenant du β-mercaptoéthanol $1,4 \times 10^{-3}$ M. Dans le but d'étudier les propriétés de l'enzyme synthétisé en présence de $\left[2\text{-}C^{14}\right]$ -2-thiouracile, 250 μl de la suspension bactérienne préalablement soumise durant 24 heures aux conditions de dérépression en présence de $\left[2\text{-}C^{14}\right]$-2-thiouracile, ont été prélevés. Les bactéries ont été perméabilisées par le toluène 0,18 M et la suspension extensivement dialysée dans les conditions décrites dans "Méthodes" pour éliminer le $\left[2\text{-}C^{14}\right]$-2-thiouracile libre.

Les trois extraits cellulaires ont été testés dans les conditions standards pour l'étude des activités spécifiques, des rapports d'activités aux pH 7 et pH 8,4 et les pourcentages d'inhibition par le C T P.

TABLEAU XVIII

Propriétés de la 2-ThioU-ATCase synthétisée en présence de $\left[2\text{-}C^{14}\right]$ -2-thiouracile

Conditions de dérépression	Activités spécifiques	Rapport d'activité pH 7 : pH 8,4	% Inhibition par CTP 5×10^{-4}M
normales	1 130	3,3	44 %
+ 2-thiouracile (10^{-3}M)	500	1,1	31 %
+ $\left[2\text{-}C^{14}\right]$ -2-thiouracile (10^{-3}M)	640	0,90	25 %

Après un traitement au sonicateur Biosonic III, la 2-ThioU-ATCase a été purifiée dans les conditions décrites dans "Méthodes". A la fin de chaque étape en cours de purification, la radioactivité des fractions possédant l'activité aspartate transcarbamylase a été mesurée. Sur le Tableau XIX sont comparées les quantités respectives d'enzyme et de $\left[2\text{-}C^{14}\right]$ -2-thiouracile mesurées dans ces fractions.

Cette expérience conduit à plusieurs observations : D'abord seule une faible fraction (2,3 %) du 2-thiouracile présent dans le milieu est rentré dans les bactéries, ce qui correspond à une molarité intracellulaire en 2-thiouracile de 10^{-3} M à 10^{-2} M. Il est remarquable que cette concentration intracellulaire suffise à provoquer la modification de l'ATCase. L'autre résultat important est que la fraction totalement purifiée d'enzyme contient une concentration en 2-ThioU-ATCase cent fois supérieure à celle du $\left[2\text{-}C^{14}\right]$ -2-thiouracile. Cette proportion de une molécule de 2-thiouracile liée pour cent molécules d'enzyme est trop faible pour que l'on puisse conclure à une modification de l'ATCase par liaison covalente entre l'enzyme et le 2-thiouracile. Ce résultat n'élimine pas cependant le fait (peu probable) qu'un métabolite dérivé du 2-thiouracile, ayant perdu la fonction carbonée en position deux du noyau pyrimidique ait pu se lier à l'ATCase.

L'étape de purification au cours de laquelle la fraction qui contient l'activité enzymatique s'apauvrit en $\left[2\text{-}C^{14}\right]$ -2-thiouracile de presque 100 %, tandis que la perte en enzyme est de l'ordre de 9 %, correspond au passage d'une solution de protéines contenant une forte proportion d'acides nucléiques (cette solution contenait une importante radioactivité non dialysable (Tableau XIX)) sur colonne de D E A E Séphadex A-50. Il a été démontré que cette étape de purification permet d'éliminer les contaminants ayant une forte absorption à 260 mμ , c'est-à-dire d'éliminer les acides nucléiques.

TABLEAU XIX

Purification de la 2-ThioU-ATCase synthétisée en présence $[2\text{-}C^{14}]$-2-thiouracile

Les bactéries cultivées durant 24 heures dans 10 ml du milieu standard de dérépression en présence de $[2\text{-}C^{14}]$-2-thiouracile 10^{-3} M, ayant atteint une densité optique de 0,85, ont été lavées deux fois par 10 ml de tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 7,0, β-mercaptoéthanol 1,4 mM. Les cellules ont alors été resuspendues dans 20 ml de tampon Tris-HCl 0,01 M, pH 9,2, contenant 75 mg de 2-ThioU-ATCase "entraîneur". Après sonication des bactéries, l'enzyme a été purifié selon le processus décrit dans "Méthodes". Après chaque étape, la radioactivité des fractions contenant l'activité enzymatique a été déterminée.

La quantité de 2-ThioU-ATCase dans l'extrait bactérien à la fin de la dérépression a été estimée à partir des valeurs des activités spécifiques de l'enzyme dans un aliquote de 250 μl de suspension de bactéries perméabilisées au toluène (640 unités/mg de protéines) et de l'enzyme purifié (6 400 unités/mg). La mesure de la quantité de protéines dans l'aliquote de suspension cellulaire traitée au toluène a permi d'évaluer à 5 mg, par la méthode de LOWRY et coll. / 38 /, le contenu en protéines totales des 10 ml de culture. Après addition de l'enzyme entraîneur, le pourcentage d'enzyme recouvré à la suite de chaque étape de purification correspond à celui mesuré pour l'enzyme entraîneur (a) ou est estimé selon les rendements obtenus lors des études faites au préalable au cours de la mise au point de la purification (b).

TABLEAU XIX

Purification de la 2-ThioU-ATCase synthétisée en présence $[2\text{-}C^{14}]$-2-thiouracile

Etapes	2-ThioU-ATCase µmoles	$[2\text{-}C^{14}]$-2-thiouracile µmoles	2-thiouracile / 2-ThioU-ATCase
Suspension cellulaire dans le milieu à la fin de la déré-pression	$1,6 \times 10^{-3}$ [a]	10	6 250
Cellules lavées et soniquées	$1,6 \times 10^{-3}$ [a]	0,23	144
Filtrat après chauffage à 55°C	$1,2 \times 10^{-3}$ [b]	0,23	190
Culot précipité par $(NH_4)_2SO_4$ 1,7 M, dissous et dialysé	$1,14 \times 10^{-3}$ [a]	$2,3 \times 10^{-2}$	20
Enzyme recueilli après passage sur DEAE-Séphadex et précipitation par $(NH_4)_2SO_4$ 2,17 M	$1,04 \times 10^{-3}$ [a]	$4,2 \times 10^{-5}$	0,04
Enzyme précipité deux fois à pH 5,9 puis dissous et dialysé contre le phosphate de potassium, 0,04 M, pH 7,0	$9,1 \times 10^{-4}$ [a]	10^{-5}	0,01

La seconde hypothèse, susceptible d'expliquer la modification de l'ATCase suppose que le 2-thiouracile agit en agent complexant du zinc. Le zinc, associé aux sous-unités régulatrices / 12 , 13 / est essentiel à l'association des sous-unités et au maintien de la structure quaternaire de l'enzyme / 8 , 11 /. Bien qu'une telle hypothèse restreigne la modification au niveau des seules sous-unités régulatrices, la 2-ThioU-ATCase pourrait présenter, entre autres particularités, une déficience en zinc. L'analyse du contenu en zinc de la 2-ThioU-ATCase a donc été réalisée.

5.4 - La 2-ThioU-ATCase n'est pas un Enzyme Déficient en Zinc

Puisque le zinc n'est pas requis de façon absolue par les sous-unités régulatrices pour la liaison du CTP / 10 , 12 /, les propriétés particulières de la 2-ThioU-ATCase pourraient résulter d'une déficience en zinc de cet enzyme. Ceci pourrait être une conséquence d'une chélation du métal pour le 2-thiouracile dans le milieu de culture.

Le contenu en zinc de la 2-ThioU-ATCase a été déterminé par spectrophotométrie d'absorption atomique, comparativement à celui de l'ATCase. Les résultats, indiqués sur le Tableau XX, ne montrent pas de différence significative entre les contenus en métal des deux enzymes. La faible différence observée n'excède pas un atome de métal par molécule d'enzyme, et est du même ordre de grandeur que les variations trouvées dans le cas de l'ATCase normale d'une préparation à une autre / 8 , 13 /.

Les propriétés de la 2-ThioU-ATCase demeurent, en outre, inchangées après incubation pendant 30 minutes à 37°C en présence d'un large excès de zinc. Le même résultat a été obtenu lorsque les sous-unités catalytiques et régulatrices 2-ThioU-modifiées ont été recombinées en présence d'un excès de métal. D'autre part, lorsque les sous-unités provenant de la dissociation de l'ATCase normale sont recombinées en présence de 500 µg/ml de 2-thiouracile, l'enzyme complet obtenu possède des propriétés allostériques et catalytiques normales (Chapitre 5, paragraphe 5.1.2.2).

Ces expériences n'ont montré aucune preuve de l'existence d'une interaction directe covalente entre le 2-thiouracile et les chaînes protéiques, ou d'une chélation du zinc par cette molécule. Par contre, le fait que la 2-thiocytosine modifie l'ATCase au même titre que le 2-thiouracile (paragraphe 5.3.1), et aussi le fait que la fraction radioactive de l'extrait cellulaire déréprimé en présence de $\left[2\text{-}C^{14}\right]$ -2-thiouracile, soit éliminée en même temps que les acides nucléiques au cours de la

TABLEAU XX

Contenu en zinc de la 2-ThioU-ATCase

Le contenu en zinc a été déterminé dans les conditions décrites dans "Méthodes" par spectrophotométrie d'absorption atomique. Les concentrations en protéines ont été déterminées par la méthode de LOWRY et coll. / 38 / en utilisant la sérum albumine bovine comme standard. Les résultats ont été corrigés en considérant ces valeurs comme étant de 20 % supérieures aux concentrations réelles en ATCases (voir "Méthodes").

Les moyennes et déviations standards ont été calculées à partir de sept déterminations réalisées sur deux préparations différentes de chaque espèce d'enzyme.

TABLEAU XX

Contenu en zinc de la 2-ThioU-ATCase

Enzymes	Zn (atomes.gr) par mole d'enzymes
2-ThioU-ATCase	5,4 ± 0,5
ATCase	6,1 ± 0,4

purification de l'enzyme (paragraphe 5.3.2) favorisent l'hypothèse selon laquelle les 2-thiopyrimidines seraient incorporées aux acides nucléiques.

A l'appui de cette hypothèse existe le fait que le 2-thiouracile sert de substrat à certains enzymes du métabolisme des pyrimidines. Le 2-thiouracile est en effet enzymatiquement transformé en 2-thiouridine / 81 / et en 2-thio-UMP / 82 , 83 / tandis que le 2-thio-UDP est utilisé comme substrat par la polynucléotide phosphorylase / 84 /. Le 2-thiouracile est donc susceptible d'être converti en une forme triphosphate permettant son incorporation dans les ARNs messagers ou (et ?) de transfert. Il a en effet été démontré que le 2-thio-UTP peut remplacer (bien que moins efficacement) l'UTP dans la transcription de l'ADN par la RNA polymérase de E. Coli / 85 /.

Cette incorporation du 2-thiouracile dans les ARNs, si elle existe, pourrait être responsable de la modification des propriétés enzymatiques observée non seulement dans le cas de l'ATCase mais aussi dans le cas d'autres protéines synthétisées en présence de ce métabolite / 86 /. La modification des protéines synthétisées en présence du 2-thiouracile serait alors la conséquence d'une mauvaise lecture du code génétique au moment de la traduction. Le 2-thiouracile pourrait aussi agir indirectement sur la synthèse de protéines anormales en perturbant le processus de synthèse des ARN messagers ou de transfert.

Ces observations nous ont conduit à comparer les compositions en acides aminés de la 2-ThioU-ATCase et de ses sous-unités à celles des espèces enzymatiques normales.

5.5 - Composition en Acides-Aminés de la 2-ThioU-ATCase et de ses Sous-Unités

Dans le but de déceler entre les protéines normales et 2-ThioU-modifiées d'éventuelles différences dans la composition en acides aminés, les protéines ont été hydrolysées dans les conditions "standards" décrites dans "Méthodes" ou dans les conditions particulières à l'analyse du contenu en cystéines.

5.5.1 - Composition en acides aminés après hydrolyse dans les conditions standards

Les ATCases normale et 2-ThioU-modifiée et leurs sous-unités ont été hydrolysées par HCl 6 N, puis la composition en acides aminés déterminée dans les conditions "standards" décrites dans "Méthodes". Les résultats obtenus, résumés dans les Tableaux XXI a et b, ne montrent pas de différence entre les compositions en acides aminés des protéines normales et 2-ThioU-modifiées, dans la limite de sensibilité de la méthode utilisée. Dans le cas des sous-unités régulatrices, une seule différence est observée, qui concerne le contenu en méthionine. Compte tenu du poids moléculaire des chaînes régulatrices (17 000), ce résultat indiquerait la présence d'un résidu méthionine supplémentaire par chaîne 2-ThioU-régulatrice. Cependant les sous-unités régulatrices normales elles-mêmes contiennent parfois un résidu méthionine supplémentaire en position N-terminale dû probablement à un défaut d'élimination de la N-formyl-méthionine / 4 /. On peut imaginer que dans les conditions particulières de dérépression dues à la présence du 2-thiouracile, ce processus d'élimination des N-formyl-méthionines initiatrices de la synthèse polypeptidique, ne puisse se produire. Cette hypothèse doit être analysée, mais, bien qu'elle puisse contribuer à expliquer les propriétés particulières de la 2-ThioU-ATCase, il semble peu vraisemblable qu'elle puisse rendre compte de l'ensemble des modifications de l'enzyme.

5.5.2 - Composition en cystéines après oxydation performique

Après oxydation performique, réalisée selon la technique décrite dans "Méthode", des échantillons des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée ont été analysés

TABLEAU XXI a

Composition en acides aminés de la 2-ThioU-ATCase et de ses sous-unités

Les échantillons ont été hydrolysés par HCl 6 N à 110°C en tubes scellés sous vide durant 24 heures ou 72 heures. Puis la composition en acides aminés a été déterminée à l'aide d'un analyseur d'amino-acides selon le processus décrit dans "Méthodes". Les moyennes et déviations standards ont été calculées à partir de six à sept analyses faites sur deux préparations différentes des enzymes natifs et des sous-unités catalytiques normaux ou 2-ThioU-modifiés, et à partir de deux analyses sur chacune des deux espèces de sous-unités régulatrices. La déviation standard sur chaque détermination ne dépasse pas 5 %. Les temps d'hydrolyse n'ont pas influencé les résultats dans la plupart des cas, sauf pour la valine et l'isoleucine, pour lesquels sont exprimés les résultats correspondant à 72 heures d'hydrolyse.

TABLEAU XXI a

Composition en acides aminés de la 2-ThioU-ATCase et de ses sous-unités

Acides aminés	µmoles par mg de protéines					
	ATCase	2-ThioU-ATCase	Sous-unité Catalytique	S.U.2-ThioU Catalytique	Sous-unité Régulatrice	S.U.2-ThioU Régulatrice
ASP	1,13	1,06	1,02	0,99	1,17	1,04
THREO	0,47	0,48	0,49	0,49	0,40	0,46
SER	0,57	0,55	0,49	0,51	0,62	0,59
GLU	0,89	0,93	0,78	0,84	1,02	1,03
PRO	0,39	0,38	0,30	0,33	0,48	0,46
GLY	0,42	0,44	0,41	0,47	0,39	0,49
ALA	0,88	0,86	0,98	0,95	0,59	0,68
VAL	0,64	0,65	0,58	0,64	0,65	0,68
MET	0,15	0,16	0,19	0,19	0,04	0,10
LEU	0,48	0,49	0,37	0,41	0,66	0,62
EU	1,08	1,05	1,1	1,07	0,94	0,91
YR	0,20	0,22	0,22	0,22	0,17	0,19
PHE	0,33	0,35	0,34	0,34	0,29	0,29
LYS	0,49	0,54	0,42	0,49	0,71	0,67
HIS	0,29	0,28	0,31	0,30	0,30	0,25
ARG	0,45	0,47	0,43	0,47	0,48	0,50

TABLEAU XXI b

Composition en acides aminés de la 2-ThioU-ATCase et de ses sous-unités

Les résultats exprimés sur le Tableau XXI a en µ moles d'acides aminés par mg de protéines sont ici calculés en moles d'acides aminés par mole de RC , de C ou de R .

TABLEAU XXI b

Composition en acides aminés de la 2-ThioU-ATCase et de ses sous-unités

Acides aminés	moles de résidus par mole de protéines					
	ATCase	2-ThioU-ATCase	Sous-unité Catalytique	S.U.2-ThioU Catalytique	Sous-unité Régulatrice	S.U.2-ThioU Régulatrice
ASP	58,4	54,8	34	33	19,3	17,2
THREO	24,3	24,8	16,3	16,3	6,6	7,6
SER	29,4	28,4	16,3	17,0	10,2	9,7
GLU	46	48	26,0	28,00	16,8	17
PRO	20,15	19,6	10	11,0	7,9	7,6
GLY	21,7	22,7	13,7	15,7	6,44	8,1
ALA	45,5	44,4	32,7	31,7	9,7	11,2
VAL	33	33,6	19,3	21,3	10,7	11,2
MET	7,75	8,26	6,3	6,3	0,66	1,6
LEU	24,8	25,3	12,3	13,7	10,9	10,2
LEU	55,8	54,2	36,7	35,7	15,5	15,0
TYR	10,3	11,4	7,3	7,3	2,8	3,1
PHE	17	18	11,3	11,3	4,8	4,8
LYS	25,3	27,9	14,0	16,3	7,7	11,0
HIS	15	14,5	10,3	10,0	4,9	4,1
ARG	23,2	24,3	14,3	15,7	7,9	8,25

pour leur contenu en acide cystéique. Les résultats indiqués sur le Tableau XXII montrent que s'il existe une légère différence dans le contenu en cystéine des deux types d'enzymes, elle est de l'ordre des écarts expérimentaux et ne peut rendre compte, dans les limites de la méthode utilisée, d'un défaut ou d'une addition sensible de résidu cystéine ou demi-cystine dans la 2-ThioU-ATCase.

Les fonctions sulfhydriles existent toutes à l'état réduit dans l'ATCase native. Bien que, de la même manière que l'ATCase, la 2-ThioU-ATCase soit dissociable en sous-unités au cours de l'incubation en présence de réactifs spécifiques des fonctions sulhydriles réduites (Chapitre I, paragraphe 1.1.5), certaines fonctions sulfhydriles pourraient, dans cet enzyme, être oxydées ou substituées. L'oxydation performique précédemment décrite, ne peut pas mettre de tels phénomènes en évidence.

Le réactif spécifique des fonctions sulfhydriles réduites 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoate) a donc été utilisé, afin de déterminer la proportion de cystéines réduites dans la 2-ThioU-ATCase. Les résultats obtenus par titration spectrophotométrique du contenu en groupements sulfhydriles directement accessibles par le DTNB en milieu dénaturant, sont indiqués dans le Tableau XXIII, et montrent qu'aucune différence n'est décelable entre les contenus en cystéines réduites de la 2-ThioU-ATCase et de l'ATCase.

Si le 2-thiouracile provoque effectivement des anomalies dans la séquence des ARNs messagers codant pour l'ATCase ou dans celle des ARNs de transferts, les erreurs produites au niveau de la composition en acides-aminés peuvent être rares, ponctuelles et donc indécelables à l'aide des techniques utilisées. Deux faits sont à noter cependant : d'une part, toutes les molécules d'ATCase synthétisées en présence de concentrations suffisantes en 2-thiouracile sont modifiées. En effet, un mélange d'ATCases normale et modifiée aurait manifesté des interactions homotropes proportionnellement égales au nombre de molécules enzymatiques normales, ce qui n'est pas le cas.

TABLEAU XXII

Analyse du contenu en cystéines de la 2-ThioU-ATCase

Après oxydation performique de 2 mg de protéines selon la méthode de MOORE / 53 / et hydrolyse par HCl 6 N dans les conditions décrites dans "Méthodes", le contenu en acide cystéique des échantillons a été déterminé à l'aide d'un analyseur automatique d'acides aminés Technicon, modèle 3 A.1.

Les moyennes et déviations standards ont été calculées à partir de six déterminations effectuées sur deux préparations distinctes de chacun des deux enzymes.

TABLEAU XXII

Analyse du contenu en cystéines de la 2-ThioU-ATCase

	Contenu en acide cystéique	
	μ mole/mg de protéines	moles/mole d'enzyme
ATCase	0,099 $\pm$ 0,013	30,7 $\pm$ 4
2-ThioU-ATCase	0,086 $\pm$ 0,012	26,7 $\pm$ 3,7

TABLEAU XXIII

Détermination des groupements sulfhydriles dans la 2-ThioU-ATCase

Des solutions de 0,5 ml de chaque enzyme dans un tampon Tris-acétate 0,2 M, pH 8,2, contenant 50 à 500 μg de protéines ont été ajoutés à 1,5 ml d'une solution de 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoate) (DTNB) 3×10^{-3} M, dans l'urée 10 M et le tampon Tris-acétate pH 8,2, 0,2 M. La quantité d'anions thio-nitrobenzoate formés, qui est égale à celle des groupements sulfhydriles ayant réagit, a été déterminée dans ce mélange par l'étude dé l'absorption à 412 mμ

Les moyennes et déviations standards résultent de l'étude de trois préparations différentes de chaque type d'enzyme, et de quatre concentrations différentes de chaque préparation.

TABLEAU XXIII

Détermination des groupements sulfhydriles dans la 2-ThioU-ATCase

Enzymes	moles de groupements -SH par mole d'enzyme
ATCase	29,67 ± 0,53
2-ThioU-ATCase	30,02 ± 1,18

D'autre part, le fait qu'il n'existe pas de zone de chevauchement entre les bandes correspondantes aux ATCase et 2-ThioU-ATCase après migration sur gel de polyacrylamide souligne que toutes les molécules correspondant à cette deuxième espèce d'enzyme sont physiquement modifiées. Néanmoins la bande représentative de la 2-ThioU-ATCase est plus diffuse que celle qui correspond à l'ATCase, indiquant certainement une hétérogénéité de charges, et donc par voie de conséquence, une hétérogénéité de structure.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

1 - Les Interactions Hétérotropes Négatives entre les Sites Catalytiques et Régulateurs sont Dissociables des Interactions Homotropes

Lorsque l'aspartate transcarbamylase est synthétisée par Escherichia coli en présence de 2-thiouracile, un enzyme modifié (2-ThioU-ATCase) est obtenu, qui ne manifeste plus les interactions homotropes coopératives entre sites de liaison du substrat aspartate, mais demeure l'objet des interactions hétérotropes entre sites catalytiques et régulateurs. Les deux espèces d'interactions sont dans d'autres cas simultanément abolies lorsque l'ATCase est soumise à des traitements dissociants. Ainsi, l'action de la chaleur / 2 /, des ions de métaux lourds / 2 /, du SDS / 87 / conduisent à l'obtention de sous-unités catalytiques, qui, isolées des sous-unités régulatrices ne manifestent plus de coopérativité pour la liaison de l'aspartate en présence de carbamylphosphate, ni de sensibilité aux nucléotides effecteurs. La cinétique hyperbolique de saturation par l'aspartate et le manque total de sensibilité aux effecteurs de l'espèce C_3R_6 / 25 / ont démontré que deux sous-unités catalytiques doivent être associées par l'intermédiaire des sous-unités régulatrices pour que les interactions homotropes et hétérotropes se manifestent.

Bien que les interactions homotropes soient abolies dans la 2-ThioU-ATCase, cet enzyme est une molécule native, constituée des deux espèces de sous-unités catalytiques et régulatrices en proportion normale. En présence de concentrations en CTP fortement inhibitrices de l'activité, les interactions homotropes coopératives entre sites catalytiques ne réapparaissent pas, indiquant que la régulation de l'activité sous l'influence des substrats, d'une part, et du rétroinhibiteur, d'autre part, sont des phénomènes dissociables.

Les sous-unités de la 2-ThioU-ATCase ont été isolées, et l'étude de leurs propriétés particulières a été réalisée dans le but d'analyser les relations entre ces propriétés et la régulation de l'activité enzymatique.

L'inhibition par le CTP de l'activité de la 2-ThioU-ATCase s'effectue selon un mécanisme analogue à celui qui est observé dans le cas de l'ATCase. En effet, le pourcentage d'inhibition augmente avec la concentration en CTP de manière comparable pour les deux espèces d'enzymes, hormis la différence d'efficacité. De plus, les modalités d'action du CTP, telles que la dépendance de l'inhibition vis-à-vis du pH, sa réversibilité par l'aspartate, et la nature des changements conformationnels observés par spectroscopie de dichroïsme circulaire consécutifs à la liaison du CTP sont aussi analogues. Ces résultats indiquent que le nucléotide agit sur un équilibre entre deux conformations d'affinités différentes pour l'aspartate, et que cet équilibre n'est pas celui qui est impliqué dans les effets coopératifs.

Les interactions homotropes et hétérotropes peuvent donc être dissociées et doivent correspondre à des mécanismes moléculaires distincts. En conséquence, un simple modèle à deux états ne peut rendre compte du comportement de l'aspartate transcarbamylase.

Plusieurs types d'observations conduisent de même à la conclusion que les changements conformationnels correspondant aux deux espèces d'interactions ne sont pas exactement inverses l'un de l'autre :

BUCKMAN / 90 / a montré à l'aide de la technique des "marqueurs de spin", que la détection des changements de conformation induits par la liaison du succinate en présence du carbamylphosphate nécessite l'emploi de "marqueurs de spin" différents de ceux utilisés pour observer les changements de conformation dus à la liaison du CTP.

D'autre part, ECKFELDT, HAMMES, MOHR et WU / 91 , 92 , 93 / ont étudié les changements de conformation résultant de la fixation sur l'ATCase du succinate (analogue du substrat aspartate) en présence du carbamylphosphate et du Br-CTP (analogue du rétroinhibiteur), par la technique de "sauts" de température.

Deux phénomènes de relaxation différents ont été observés lorsque l'ATCase était en équilibre avec le Br-CTP, d'une part, et avec le succinate en présence de carbamylphosphate, d'autre part. Un phénomène lent correspond à la transition conformationnelle induite par le succinate / 92 /, et un phénomène rapide est associé à la transition conformationnelle induite par le Br-CTP / 91 , 92 /. En présence des deux ligands (Br-CTP et succinate), les deux phénomènes de relaxation sont observés. Si le Br-CTP et le succinate avaient agi de façon réverse sur un même équilibre, seul le mécanisme de relaxation le plus rapide aurait été observé.

GRIFFIN, ROSENBUSCH, BLOUT et WEBER / 44 / ont, d'autre part, montré par spectroscopie de dichroïsme circulaire différentielle que la liaison du carbamylphosphate et du succinate à l'ATCase provoque une perturbation dans l'environnement du site métallique des sous-unités régulatrices. Par contre, la liaison du CTP n'induit aucune perturbation de ce site métallique. Selon ces résultats, un équilibre conformationnel impliquant le site métallique et le site actif est lié aux interactions homotropes et non aux interactions hétérotropes.

Enfin, GIBBONS, RITCHEY et SCHACHMAN / 32 / ont étudié la sensibilité au CTP d'une ATCase dont les sous-unités régulatrices sont normales mais dont une seule des six chaînes catalytiques est active. Les interactions homotropes ne peuvent donc se manifester dans cet enzyme. Parce que l'affinité de cet enzyme pour l'aspartate est extrêmement faible, celle-ci se trouverait selon ces auteurs dans l'état "contraint" (forme T du modèle concerté). Ces auteurs ont cependant montré que l'activité de cet enzyme est normalement inhibée par le CTP, ce qui ne pourrait s'observer si le CTP agissait en réservant l'équilibre $T \rightleftharpoons R$ entre deux états d'affinités différentes pour les substrats.

Ces résultats, et ceux obtenus par l'étude de la 2-ThioU-ATCase indiquent que les changements conformationnels dus à la liaison du CTP sont dissociables de ceux qui sont impliqués dans les effets coopératifs entre les sites catalytiques. Les deux types d'interactions ne correspondent pas à un déplacement en sens inverse d'un même équilibre.

2 - L'Etat Conformationnel des Sous-Unités Régulatrices Joue un Rôle Essentiel dans les Interactions Homotropes entre Sites Catalytiques

Les informations recueillies par l'étude de formes enzymatiques "hybrides" constituées de sous-unités normales et 2-ThioU-modifiées ont été essentielles à la compréhension du rôle de chaque espèce de sous-unités dans les processus de régulation allostérique.

L'association des sous-unités 2-ThioU-régulatrices aux sous-unités catalytiques normales produit un enzyme dépourvu d'interactions homotropes coopératives entre les sites catalytiques, mais qui présente, au même titre que la 2-ThioU-ATCase, les interactions hétérotropes. Par contre, les interactions homotropes sont restaurées dans l'espèce enzymatique constituée de sous-unités 2-ThioU-catalytiques et de sous-unités régulatrices normales.

La modification des sous-unités 2-ThioU-régulatrices est donc responsable de la perte des interactions homotropes entre les sous-unités catalytiques. De plus, les sous-unités 2-ThioU-catalytiques, bien que modifiées en ce qui concerne leur efficacité catalytique, demeurent sensibles à ces interactions lorsque les sous-unités régulatrices qui les relient au sein d'une même molécule d'enzyme sont normales.

D'autres formes d'ATCase, qui possèdent une proportion normale des deux espèces de sous-unités ont été décrites, dans lesquelles les interactions homotropes, et parallèlement les interactions hétérotropes sont abolies :

Mc CLINTOK et MARKUS / 76 / ont montré que la digestion ménagée de l'ATCase par la trypsine conduit à l'obtention d'un enzyme d'activité normale en présence d'aspartate 15 mM mais qui a perdu les interactions homotropes et hétéro-

tropes. L'analyse de l'échantillon a révélé que les sous-unités régulatrices étaient préférentiellement attaquées par la trypsine.

NAGEL et SCHACHMAN / 31 / ont, d'autre part, étudié les propriétés d'une ATCase dont toutes les sous-unités régulatrices sont modifiées par liaison covalente de 4, 6 résidus succinylés par chaîne. Cet enzyme, qui ne possède plus d'affinité vis-à-vis du CTP est, non seulement insensible à la rétroinhibition mais, de plus, ne manifeste plus aucune interaction homotrope entre les sites catalytiques.

Au contraire, des molécules d' "ATCases hybrides" constituées à partir de chaînes régulatrices normales et de chaînes catalytiques dont deux à quatre sont inactivées par modification chimique, conservent partiellement leur aptitude à manifester les deux types d'interactions / 30 , 32 /. Ces formes d'enzymes, dont les activités spécifiques sont proportionnelles aux nombres de sites catalytiques actifs, manifestent les interactions homotropes (dont l'intensité est néanmoins affectée), quelles que soient les positions des chaînes inactives dans l'oligomère. Elles présentent également les interactions hétérotropes avec une intensité analogue à la normale.

Ainsi les formes moléculaires d'ATCases dans lesquelles les interactions homotropes entre les sites catalytiques ont été abolies ont pour point commun le fait que les sous-unités régulatrices sont altérées dans leur structure. Par contre, les sous-unités catalytiques peuvent partiellement perdre leurs fonctions catalytiques sans que les interactions homotropes entre les sites demeurés actifs ne soient abolies.

Les résultats obtenus par l'étude des propriétés de la 2-ThioU-ATCase, et parallèlement des espèces moléculaires décrites ci-dessus, ont donc montré en ce qui concerne les interactions homotropes :

a) que les deux sous-unités catalytiques doivent être associées par l'intermédiaire des sous-unités régulatrices pour l'existence des interactions homotropes entre les sites catalytiques, même entre sites situés au sein du même trimère ;

b) que l'altération des seules sous-unités régulatrices est suffisante pour l'abolition des interactions homotropes coopératives entre les sites catalytiques. Ainsi les sous-unités régulatrices jouent un rôle essentiel dans l'existence des interactions homotropes ;

c) que les sous-unités catalytiques peuvent être modifiées dans leur activité sans abolition des interactions homotropes entre les sites demeurés actifs.

3 - L'Etat Conformationnel des Sous-Unités Régulatrices Conditionne l'Efficacité de la Rétroinhibition

Le fait que la molécule d' "ATCase hybride", reconstituée à partir des sous-unités 2-ThioU-catalytiques et des sous-unités régulatrices normales soit normalement rétroinhibée par le CTP indique que la modification des sous-unités 2-ThioU-régulatrices est responsable de la diminution du pourcentage d'inhibition dans la 2-ThioU-ATCase. La modification des sous-unités 2-ThioU-régulatrices pourrait intervenir à deux niveaux :

- d'une part, aux sites d'interactions directes entre les chaînes catalytiques et régulatrices ou (et ?) aux sites d'interactions entre les chaînes régulatrices responsables des effets hétérotropes ;
- d'autre part, aux sites de liaison du CTP dont l'affinité vis-à-vis du nucléotide serait diminuée.

Différents auteurs ont en effet montré que des altérations de l'ATCase à ces deux niveaux conduisent à une diminution de l'efficacité de rétroinhibition. Par contre, des modifications chimiques susceptibles de rendre inactives deux à cinq chaînes catalytiques peuvent ne pas altérer la nature des interactions hétérotropes entre les sous-unités catalytiques et régulatrices. Ceci est le cas des ATCases reconstituées à partir de sous-unités régulatrices normales et de sous-unités catalytiques inactivées par pyridoxylation, dont la sensibilité au CTP et à l'ATP est normale / 32 /.

Plusieurs exemples de modifications du nombre ou de la nature des sous-unités régulatrices ont montré que l'affaiblissement des forces de liaison entre les trois dimères de chaînes régulatrices et les deux trimères de chaînes catalytiques se traduit par une diminution de l'efficacité d'inhibition :

Ainsi l'espèce C_6R_4, dans laquelle manque une sous-unité régulatrice est l'objet d'une altération des forces de liaison entre sous-unités telle que l'amplitude des interactions homotropes d'une part, et celle des interactions hétérotropes d'autre part, sont diminuées. Tandis qu'à pH 7, l'amplitude de la coopérativité et de la rétroinhibition de l'espèce C_6R_4 représente les deux-tiers de la normale / 29 /, à pH 8,3 la réduction de ces transitions allostériques est plus grande / 28 /, et donc supérieure à la réduction attendue proportionnellement à la perte d'une sous-unité régulatrice / 28 /. Ainsi l'absence d'une sous-unité régulatrice a un effet "déstabilisant" sur la structure de l'enzyme qui se traduit par un affaiblissement des forces d'interactions qui, à l'intérieur d'une même sous-unité régulatrice, ou (et ?) entre les sous-unités régulatrices et catalytiques sont responsables des effets hétérotropes.

Par ailleurs, des molécules d' "ATCases hybrides" constituées de deux sous-unités catalytiques et de trois sous-unités régulatrices, dont une ou deux ont été succynilées et sont, en conséquence, incapables de lier le CTP, ont été étudiées en ce qui concerne les deux types d'interactions / 31 /. Les résultats ont confirmé que la diminution de la rétroinhibition n'est pas strictement dépendante de la perte des sites de liaison pour le CTP mais qu'elle provient en outre d'altérations dans la structure de l'ensemble de la molécule enzymatique.

Le nombre de sites de liaison du CTP apparaît normal dans la 2-ThioU-ATCase. A l'image des résultats décrits ci-dessus, le fait que le pourcentage d'inhibition par le CTP soit inférieur à la normale indique donc que les interactions entre les sous-unités régulatrices et catalytiques responsables des effets hétérotropes sont affaiblies dans cet enzyme. Puisque les sous-unités régulatrices normales restaurent les effets hétérotropes lorsqu'elles sont associées aux sous-unités 2-ThioU-catalytiques, c'est la modification des sous-unités 2-ThioU-régulatrices qui est responsable de la diminution de l'amplitude des interactions hétérotropes.

L'affaiblissement des interactions responsables des effets hétérotropes, la diminution de l'efficacité de rétroinhibition et la valeur inférieure à la normale des

constantes d'affinités pour le CTP sont probablement des phénomènes liés dans la 2-ThioU-ATCase.

L'importance de la structure quaternaire de l'ATCase sur l'affinité des sites régulateurs vis-à-vis du CTP a été en effet clairement montrée. Lorsque les sites catalytiques sont saturés par les analogues de substrats, c'est-à-dire lorsque l'enzyme est à l'état "relâché", les valeurs des constantes d'association du CTP à l'ATCase diminuent, bien que l'hétérogénéité des sites demeure / 68 , 69 , 70 /. Ceci souligne que l'état conformationnel des sous-unités catalytiques influence la conformation des sous-unités régulatrices jusqu'à réduire l'affinité des sites pour le rétroinhibiteur. Ainsi, la structure des sites régulateurs dans la 2-ThioU-ATCase pourrait être proche de celle de ces sites dans l'ATCase normale transconformée vers l'état "relâché" par la fixation des substrats. TONDRE et HAMMES / 69 bis / ont montré qu'il existe dans l'ATCase une corrélation entre le pourcentage d'inhibition et celui du nombre de sites régulateurs occupés. La plus faible inhibition de l'activité de la 2-ThioU-ATCase par rapport à celle de l'enzyme normal en présence d'une même concentration en CTP et la baisse d'affinité des sites régulateurs sont probablement des phénomènes associés.

4 - Les Interactions Hétérotropes Positives entre les Sites Catalytiques et Régulateurs Peuvent se Manifester en l'Absence des Interactions Homotropes

Les interactions hétérotropes positives entre les sites catalytiques et régulateurs sont aussi largement présentes dans la 2-ThioU-ATCase, puisque l'activité de cet enzyme est sensiblement stimulée par l'ATP.

Bien que le mécanisme d'action de l'ATP, dont l'affinité vis-à-vis des sites régulateurs de l'ATCase est inférieure à celle du CTP, soit moins bien connu que dans le cas du rétroinhibiteur, plusieurs observations ont été rapportées :

Sur la base d'études cinétiques de l'activité en présence de l'un et l'autre des effecteurs, qui révélaient les effets antagonistes de ceux-ci, GERHART et PARDEE / 54 / ont conclu que le CTP et l'ATP sont probablement en compétition vis-à-vis des mêmes sites régulateurs.

CHANGEUX, GERHART et SCHACHMAN / 57 / ont en outre montré par la méthode de dialyse à l'équilibre, que la liaison du CTP à l'enzyme natif et aux sous-unités régulatrices est fortement réduite en présence d'ATP.

L'interprétation selon un modèle à "deux états" du comportement allostérique de l'ATCase impliquerait que la liaison de l'ATP transconforme l'enzyme dans le même sens que le substrat aspartate vers l'état de plus grande affinité pour ce substrat. En accord avec ce modèle il a été démontré que les effets coopératifs induits par la présence d'analogues de substrats et les effets stimulateurs de l'ATP ne sont pas cumulatifs. Ainsi le pourcentage de stimulation de l'activité par l'ATP (5 mM) mesuré en présence d'aspartate 1 mM et de carbamylphosphate 5 mM passe de 280 % à 30 % en présence de PALA (5×10^{-6} M) / 94 /.

Cependant, plusieurs résultats ne sont pas compatibles avec l'interprétation que les substrats et l'ATP induisent le même changement conformationnel :

a) Des concentrations saturantes d'ATP ne changent pas le pH optimum d'activité de l'ATCase en présence de faibles concentrations en aspartate / 94 /, tandis que le pH optimum passe de 7 à 8,4 lorsque la concentration en aspartate augmente / 54 /.

b) Le spectre de différence de dichroïsme circulaire provoqué par la liaison du PALA est différent de celui qui est dû à la liaison de l'ATP. En présence de ces deux ligands, le spectre de différence est égal à la somme des spectres produits par l'addition de chacun d'eux / 68 /.

c) L'étude thermodynamique de la fixation du succinate (en présence de carbamylphosphate) et de l'ATP indique que ces ligands n'agissent pas au niveau des mêmes paramètres / 95 /.

d) Deux processus de relaxation distincts mais couplés ont été observés par la technique des "sauts de température" lorsque l'ATCase était en présence de carbamylphosphate, de succinate et d'ATP. Ce résultat indique que deux transitions conformationnelles distinctes et couplées sont induites par les substrats et l'ATP / 96 /.

Le fait que l'ATP stimule l'activité de la 2-ThioU-ATCase contribue à montrer que cet effecteur est capable d'induire un changement conformationnel distinct de celui qui est impliqué dans les interactions homotropes coopératives entre sites catalytiques. Dans le cas de l'ATCase, deux états "extrêmes" de forte affinité pour le substrat seraient accessibles, l'un consécutif à la liaison de l'ATP par l'intermédiaire des interactions hétérotropes positives entre les sites des substrats et de l'effecteur, l'autre consécutif à la liaison de l'aspartate par l'intermédiaire des interactions homotropes entre les sites catalytiques. La 2-ThioU-ATCase ne serait l'objet que du seul changement de conformation dû aux effets hétérotropes positifs. Cette

interprétation rend également compte du fait que le PALA (9×10^{-7} M) augmente de 100 % l'activité de l'ATCase dans des conditions (aspartate : 1 mM, carbamyl-phosphate : 5 mM, tampon imidazole-acétate 0,17 M, pH 7,0) où la 2-ThioU-ATCase, comme les sous-unités catalytiques sont inhibées de 33 % à 35 %, tandis que dans ces conditions l'ATP (2 mM) active l'ATCase et la 2-ThioU-ATCase respectivement de 78,5 % et 48 %. Sur le tableau ci-dessous l'influence du PALA et celle de l'ATP sur l'activité de chaque espèce moléculaire sont comparées :

	ATCase	2-ThioU-ATCase	Sous-unités catalytiques
ATP 2 mM	Activation 78,5 %	Activation 48 %	
PALA 0,9 M	Activation 100 %	Inhibition 33 %	Inhibition 35 %

Ces résultats suggèrent donc que les substrats, d'une part, et l'activateur, d'autre part, provoquent deux changements conformationnels différents qui conduisent à deux états "extrêmes" de forte affinité vis-à-vis des substrats.

Le fait que les changements conformationnels induits par la liaison des différents ligands responsables des interactions homotropes et hétérotropes peuvent être indépendamment observés ne signifie pas qu'ils soient sans relation dans l'ATCase. Il est bien établi que la coopérativité de liaison de l'aspartate est considérablement accrue en présence de CTP et diminuée en présence d'ATP / 2 /. En outre, HAMMES et WU ont montré que la vitesse du changement conformationnel induit par la liaison du succinate est augmentée en présence du Br-CTP / 92 / et diminuée en présence du SRTP (analogue de l'ATP) / 96 /.

L'ensemble des résultats peut, en première simplification, s'expliquer selon un modèle qui implique quatre états conformationnels. Les deux espèces d'interaction homotropes et hétérotropes peuvent obéir indépendamment à l'un ou l'autre des mécanismes "concerté" ou "séquentiel". La plupart des résultats ayant indiqué que les interactions homotropes entre les sites catalytiques peuvent correspondre à un modèle "concerté" tandis qu'au contraire les interactions homotropes négatives entre les sites régulateurs peuvent s'expliquer selon un modèle "séquentiel", les quatre états peuvent être représentés selon la figure 31 où T et R se réfèrent aux conformations impliquées dans les interactions homotropes coopératives entre les sites catalytiques et A et B aux conformations impliquées à la fois dans les interactions homotropes négatives entre sites régulateurs et aux interactions hétérotropes antagonistes entre les sites catalytiques et régulateurs.

Dans un tel modèle, la 2-ThioU-ATCase pourrait exister selon les deux formes en équilibre R A $\rightleftharpoons$ R B. L'ATP et le CTP agiraient sur la transconformation $A \underset{\text{CTP}}{\overset{\text{ATP}}{\rightleftharpoons}} B$, R B étant la forme la plus affine pour l'aspartate. L'ATCase présente en outre un équilibre T $\rightleftharpoons$ R entre deux formes d'affinités différentes pour l'aspartate, dont les proportions dépendent de la concentration de ce ligand dans le milieu.

La 2-ThioU-ATCase pourrait aussi se présenter selon la seule conformation R B la plus affine pour l'aspartate. Les effecteurs provoqueraient un changement "séquentiel" de cette conformation. En ce cas il faudrait concevoir deux transitions conformationnelles différentes sous l'influence de chacun des effecteurs CTP et ATP. Il semble cependant jusqu'à présent que les mécanismes d'action du CTP et de l'ATP correspondent à un changement conformationnel en sens opposé ; selon WU et HAMMES / 96 / ATP et CTP apparaissent en effet réaliser leur contrôle sur l'activité en agissant essentiellement sur le même équilibre conformationnel.

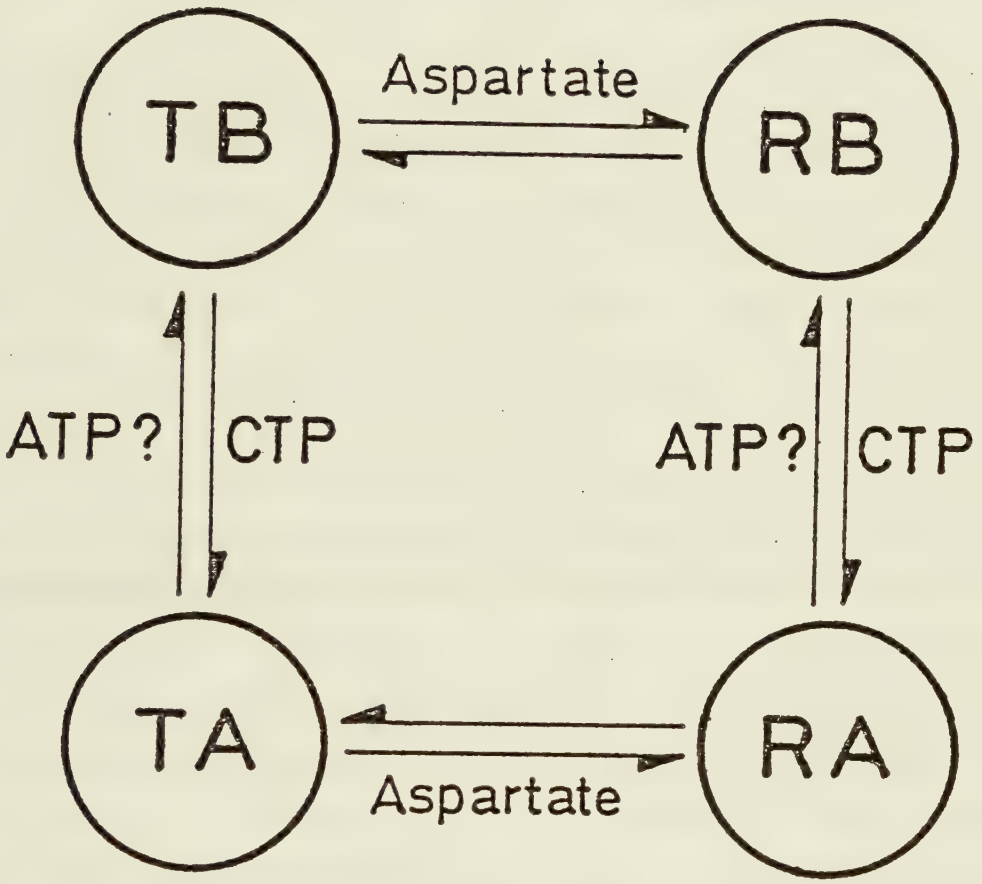
FIGURE 31

Modèle à " quatre états " pour l'ATCase.

L'ATCase est représentée selon quatre états conformationnels sur les bases suivantes :

a) T et R se réfèrent aux conformations impliquées dans les interactions homotropes coopératives entre les sites catalytiques et possédant, respectivement, une faible et une forte affinité pour l'aspartate (selon les termes du modèle "concerté" de MONOD, WYMAN et CHANGEUX / 19 /) ;

b) A et B se réfèrent aux conformations impliquées à la fois dans les interactions homotropes négatives entre les sites régulateurs, et les interactions hétérotropes antagonistes entre les sites catalytiques et régulateurs. Ces deux formes possèdent, respectivement, une faible et une forte affinité pour l'aspartate (selon les termes du modèle "séquentiel" de KOSHLAND, NEMETHY et FILMER / 20 /).


TB
Aspartate
RB
ATP?
CTP
ATP?
CTP
TA
RA
Aspartate

5 - Les Changements Conformationnels dus à la Liaison des Substrats Peuvent Etre Normalement Observés en l'Absence d'Interactions Homotropes

L'aspartate transcarbamylase est constituée de l'association de deux sous-unités catalytiques, qui sont des trimères de chaînes catalytiques identiques, par l'intermédiaire de trois sous-unités régulatrices, dont chacune est un dimère de chaînes régulatrices identiques. Deux domaines d'interactions, C : R et R : R existent donc, en plusieurs exemplaires, dans l'enzyme oligomérique. "L"unité allostérique primaire" constituée d'un dimère de chaînes régulatrices et de chacune des deux chaînes catalytiques qu'elles associent, peut se schématiser sous la forme $C_1 : R_1 : R_2 : C_2$. A l'origine de la coopérativité entre les sites catalytiques existe un changement conformationnel de la chaîne catalytiques C_1 en présence du substrat. Le changement de conformation de la chaîne catalytique C_1 envers la forme la plus affine pour ce substrat provoque, grâce aux interactions $C_1 : R_1$, une transconformation de la chaîne régulatrice, qui induit à son tour un changement d'état conformationnel de R_2 puis de C_2. Le changement conformationnel de l'ensemble des trois "unités allostériques" d'une même molécule, qui peut être "concerté" ou "séquentiel", ne peut se produire que si les aires d'interactions C : R ou R : R possèdent une structure précise. En ce qui concerne les interactions homotropes coopératives l'ensemble des résultats s'accorde avec un changement de conformation "concerté".

Concernant les propriétés particulières à la 2-ThioU-ATCase, il était intéressant d'analyser si la perte des interactions homotropes était liée à un affaiblissement ou à une perte totale des forces d'interactions entre les sous-unités responsables des interactions homotropes au niveau des domaines de liaison ainsi définis.

L'affinité des sites catalytiques pour l'aspartate dans les sous-unités catalytiques isolées, normales ou 2-ThioU-modifiées est deux fois supérieure à celle qui

correspond à l'affinité des mêmes sites dans la 2-ThioU-ATCase ou dans l'espèce hybride reconstituée à partir des sous-unités catalytiques normales et 2-ThioU-régulatrices. Ces mêmes espèces moléculaires sont aussi, bien que dépourvues d'interactions homotropes, l'objet des interactions hétérotropes entre sites catalytiques et régulateurs. Ainsi, les sous-unités 2-ThioU-régulatrices imposent, par l'intermédiaire de leur contact avec les sous-unités catalytiques normales ou 2-ThioU-modifiées des contraintes conformationnelles qui se traduisent par une diminution d'affinité des sites catalytiques vis-à-vis du substrat aspartate. Toutefois cette affinité n'est pas augmentée lorsque la concentration en substrat augmente. Par contre, dans le cas de l'ATCase normale, ces contraintes sont plus importantes et peuvent être diminuées par la liaison coopérative du substrat aspartate.

5.1 - Etat conformationnel de la 2-ThioU-ATCase

Il est donc probable qu'en absence de ligand, l'état conformationnel de la 2-ThioU-ATCase soit moins "contraint" que celui de l'ATCase. Plusieurs observations appuient cette hypothèse :

a) La thermosensibilité de la 2-ThioU-ATCase est analogue à celle des sous-unités catalytiques isolées dans des conditions où l'ATCase est stable.

b) Le pH optimum d'activité est analogue à celui des sous-unités catalytiques isolées. Ces résultats indiquent que la structure des sous-unités catalytiques dans la 2-ThioU-ATCase est plus proche de leur structure à l'état isolé que lorsqu'elles sont associées aux sous-unités régulatrices normales dans l'ATCase.

c) Il a été récemment démontré / 97 / que les groupements sulfhydriles de la 2-ThioU-ATCase, en absence de ligands, étaient plus réactifs vis-à-vis du PHMB que ceux de l'ATCase indiquant une structure plus "lâche" de la molécule. La réactivité des groupements sulfhydriles permet en effet l'analyse de l'état conformationnel de l'enzyme, puisque les groupements sulfhydriles des sous-unités régulatrices de l'ATCase deviennent beaucoup plus réactifs en présence des substrats / 24 /.

L'ensemble de ces observations montre que la structure de la 2-ThioU-ATCase est moins "contrainte" que celle de l'ATCase.

5.2 - Les changements conformationnels dus à la liaison des substrats existent normalement dans la 2-ThioU-ATCase

La liaison de substrats ou d'analogues de substrats tels que le succinate en présence de carbamylphosphate et le PALA à la 2-ThioU-ATCase et aux sous-unités 2-ThioU-catalytiques provoque des perturbations spectrophotométriques. Les méthodes d'études par spectroscopie différentielle d'absorption en ultra-violet et de dichroïsme circulaire n'ont pas révélé de différence dans la nature des changements conformationnels comparativement à ceux observés dans le cas de l'ATCase et des sous-unités catalytiques. Ceci suggère que les changements conformationnels dus à la liaison des substrats qui modifient de manière décelable l'environnement de résidus tyrosines tryptophanes et phénylalanines se produisent normalement dans la 2-ThioU-ATCase et dans les sous-unités 2-ThioU-catalytiques.

Ainsi la perte des interactions homotropes dans la 2-ThioU-ATCase n'altère pas la nature des changements conformationnels décelables autour des résidus chromophores qui sont induits par la liaison des substrats. D'autre part, le spectre de différence calculé entre le spectre d'absorption différentielle en présence de PALA de la 2-ThioU-ATCase et celui des sous-unités 2-ThioU-catalytiques dans les mêmes conditions est qualitativement semblable à celui qui est calculé entre les spectres d'absorption différentielle de l'ATCase et des sous-unités catalytiques.

Ce résultat confirme que les sous-unités 2-ThioU-catalytiques, au même titre que les sous-unités catalytiques ont une conformation plus "contrainte" dans l'enzyme natif qu'à l'état isolé. Il indique en outre que comme l'ATCase la molécule entière de 2-ThioU-ATCase manifeste au cours de la liaison des substrats le même changement conformationnel supplémentaire à celui qui est observé lorsque les substrats se lient aux sous-unités catalytiques isolées. Ces changements d'environnement supplé-

mentaires se produisent en particulier autour de résidus tyrosines qui deviennent plus exposés au milieu aqueux.

Par ailleurs, il a été démontré par spectroscopie d'absorption différentielle en ultra-violet que lorsque les sous-unités catalytiques s'associent aux sous-unités régulatrices, des résidus tyrosines et phénylalanines sont "enterrés" dans un environnement hydrophobe / 43 /. Il est donc possible d'imaginer que la liaison des substrats aux enzymes natifs provoque un changement d'environnement de ces mêmes acides aminés chromophores qui redeviennent plus exposés au solvant par suite d'une diminution des contraintes entre sous-unités.

Deux observations récentes viennent confirmer que la liaison des substrats ou de leur analogues à la 2-ThioU-ATCase transforment l'enzyme vers un état analogue à celui de l'ATCase en présence des mêmes ligands :

HOWLETT et BECK / 97 / ont en effet démontré que la réactivité des groupements sulfhydriles des deux espèces enzymatiques devenaient identiques en présence de concentrations saturantes de carbamylphosphate et de succinate. Ces mêmes auteurs ont en outre observé que le PALA réduit avec une même amplitude de 3,5 % le coefficient de sédimentation de la 2-ThioU-ATCase et de l'ATCase.

Pour KIRSHNER et SCHACHMAN / 22 / la diminution du coefficient de sédimentation de l'ATCase en présence des analogues de substrats correspond à "l'étalement" de la molécule liée à la diminution des interactions entre les sous-unités.

En outre, GERHART et SCHACHMAN / 24 / ont montré que la liaison du succinate (en présence de carbamylphosphate) et le changement conformationnel qui l'accompagne ne sont pas liés en ce qui concerne la concentration en succinate nécessaire à produire un certain taux de saturation et de changement de conformation. Par contre, dans les sous-unités catalytiques isolées, la liaison du succinate et les changements conformationnels qui en découlent varient parallèlement / 98 /. Ces études

ont montré que les chaînes catalytiques sont l'objet de changements conformationnels locaux, séquentiels, proportionnellement liés à la concentration en substrats présents, tandis que l'ATCase manifeste un changement conformationnel de "l'ensemble" de la molécule, qui apparaît "concerté" et non proportionnellement lié à la concentration en substrat / 23 /. Les changements conformationnels observés dans les sous-unités catalytiques rendent celles-ci plus "compactes" et augmentent leur coefficient de sédimentation. A l'opposé, au cours de la liaison des substrats, l'ATCase devient plus anisométrique, et son coefficient de sédimentation augmente. D'autres observations rapportées dans la littérature, telle que la sensibilité de l'activité envers le sodium dodécyl sulfate / 87 / indiquent que la liaison des substrats aux sous-unités catalytiques provoque des changements de conformations ou de propriétés dans un sens opposé à celui observé dans le cas de l'enzyme natif.

Ces résultats ont conduit à distinguer entre des changements conformationnels "locaux", directement liés à la liaison des substrats et observés sur les espèces enzymatiques du type $C_3 R_6$ ou sur les sous-unités catalytiques isolées (C_3) (qui, probablement, existent aussi dans l'ATCase), et des changements conformationnels "d'ensemble", qui sont exclusivement observés dans la molécule native capable d'interactions homotropes où ils masquent les précédents. L'analyse des spectres différentiels de dichroïsme circulaire a pu distinguer dans l'ATCase entre les changements conformationnels "locaux" et "d'ensemble" ainsi définis / 44 /. En présence de carbamylphosphate, HAMMES et WU / 92 / ont observé par la méthode des "sauts de température" que la liaison du succinate et du L-malate s'accompagnaient d'une transition conformationnelle de l'ATCase différente de celle observée dans le cas des sous-unités catalytiques isolées / 99 /. D'autre part, les études de la réactivité des groupements sulfhydriles / 24 / et de la sensibilité vis-à-vis de la protéolyse / 76 / de l'ATCase en présence des substrats caractérisaient probablement la seule transconformation de "l'ensemble" de la molécule, puisque ces phénomènes sont liés à des modifications de propriétés au niveau des sous-unités régulatrices tandis que les substrats se lient aux sous-unités catalytiques.

Les transconformations de "l'ensemble" de la molécule d'ATCase ont été exclusivement interprétées comme étant associées aux interactions homotropes coopératives.

Les résultats obtenus par l'étude de la 2-ThioU-ATCase ont montré qu'il existe malgré l'absence des interactions homotropes coopératives des changements conformationnels caractéristiques de la molécule native qui sont directement liés à la fixation des substrats.

Ainsi, la liaison des substrats aux sites catalytiques de l'ATCase induit des transconformations "locales", reflétant linéairement la saturation des sites et qui, au niveau de la molécule native, se traduisent par des changements conformationnels supplémentaires à ceux qui sont observés lors de la liaison des substrats aux sous-unités catalytiques isolées. A ces transconformations se superposent des changements conformationnels concertés, liés aux interactions homotropes coopératives.

6 - Nature de la Modification Chimique Provoquée par le 2-Thiouracile

Lorsque l'ATCase est synthétisée par Escherichia coli en présence de 2-thiouracile, il apparaît que les sous-unités régulatrices et les sous-unités catalytiques sont modifiées. Les premières sont altérées au niveau des sites d'interactions impliqués dans les effets homotropes ; et les secondes présentent une activité spécifique inférieure à la normale. Bien qu'il soit clair que le 2-thiouracile doive être présent au moment de la synthèse de l'enzyme pour que celui-ci soit modifié, le mode d'action de ce métabolite reste à éclaircir.

Le 2-thiouracile ou un métabolite dérivé de celui-ci ayant gardé le carbone porteur de la fonction sulfhydrile ne se lie pas covalamment à l'enzyme. En outre, le 2-thiouracile n'agit pas en complexant le zinc des sous-unités régulatrices.

Les compositions en acides aminés de la 2-ThioU-ATCase et de l'ATCase ne présentent pas de différence décelable. Les modifications chimiques provoquées par le 2-thiouracile sont donc très "discrètes". Néanmoins ces modifications interviennent au niveau de groupements de grande importance dans la structure et l'activité de l'enzyme.

Compte tenu des résultats déjà obtenus, deux hypothèses demeurent concernant le mode d'action du 2-thiouracile :

a) le 2-thiouracile pourrait s'incorporer aux acides ribonucléiques messagers ou (et ?) de transferts, et provoquer ainsi des erreurs, au cours de la traduction, dans la structure primaire de l'enzyme ;

b) le 2-thiouracile pourrait perturber l'une des étapes de structuration de l'enzyme après la synthèse des chaînes polypeptidiques au niveau des ribosomes.

La première hypothèse est appuyée par le fait que le 2-thiouracile est en effet susceptible d'être incorporé dans les ARNs. Ainsi, lorsque le 2-thiouracile est présent dans le milieu de culture de certains virus, ce métabolite remplace 10 % / 100 / à 20 % / 101 / du contenu en uracile des ARNs. Dans le cas des systèmes bactériens, l'incorporation du 2-thiouracile dans les ARNs est faible et contestée. Chez Escherichia coli, HAMERS et HAMERS-CASTERMAN ont constaté que le 2-thiouracile ne remplaçait plus plus de 1 % à 2 % de l'uracile dans les ARNs / 86 /, tandis que d'autres auteurs n'ont détecté aucune incorporation de 2-thiouracile / 79 , 102 , 103 /. Récemment BECK et HOWLETT / 97 / ont montré que dans des conditions de privation partielle ou complète d'uracile, le 2-thiouracile est effectivement incorporé dans les ARNs de Salmonella typhimurium et de Escherichia coli, et que la croissance de ces bactéries en présence de ce métabolite conduisait à des altérations dans les protéines synthétisées.

Pour expliquer la modification des protéines synthétisées en présence de 2-thiouracile, il faudrait admettre que, lorsqu'il est intégré auxARNs, le 2-thiouracile, qui remplace l'uracile, ne serait pas "lu" comme ce dernier. Toutefois, lorsque le 2-thiouracile remplace l'uracile en première ou seconde position "5'-terminale" d'un codon, l'adénine de l'anti-codon s'apparie parfaitement avec la base modifiée / 104 /. Dans le même système, aucun appariement n'a lieu entre le 2-thiouracile et la guanine / 104 /. En outre, le 2-thiouracile, naturellement en position 5'-terminale de l'anti-codon du t-ARN_3^{Glu} de levure s'apparie à l'adénine et non à la guanine / 105 /.

La présence du 2-thiouracile pourrait aussi perturber indirectement, en modifiant chimiquement ou en altérant la nature des bases incorporées, le fonctionnement des acides nucléiques. Ainsi GURCHINOFF et KAISER / 103 / ont montré que les tARNs de Escherichia coli cultivé en présence de 2-thiouracile n'incorporent pas ce métabolite mais sont 50 % déficients en pseudo-uridine. Puisqu'il résulte du travail de ANDERSON et SMITH / 106 / que le remplacement d'une seule base dans les tARNs de Escherichia coli en dehors de l'anti-codon provoque des changements

fonctionnels considérables, la déficience en pseudo-uridine pourrait aussi conduire à un comportement anormal des t ARNs au cours de la synthèse protéique.

L'ensemble de ces observations ne permet donc pas encore d'établir avec précision à quel niveau et par quel mécanisme le 2-thiouracile modifierait le fonctionnement des ARNs. D'autant plus que, selon les conditions expérimentales, certains résultats sont contradictoires. BECK et HOWLETT / 97 / ont déduit d'expériences génétiques que le 2-thiouracile est capable de remplacer partiellement l'uracile dans le m ARN et peut aussi provoquer un défaut de reconnaissance au cours de la traduction qui résulte en une transition phénotypique U ⟶ C . Cependant, dans ce cas il faudrait, comme ces auteurs le suggèrent, admettre que les résidus cystéine (codons UGU , UGC) ou tryptophanes (codon UGG) seraient remplacés par l'arginine (codons CGG, CGC, CGU). Cet excès d'arginine rendrait compte, en effet, de l'augmentation de charge positive dans la 2-ThioU-ATCase par rapport à l'ATCase, mais est incompatible avec le fait que le contenu en ces acides aminés apparaît être normal dans l'enzyme modifié.

Selon une seconde hypothèse, le 2-thiouracile pourrait aussi agir directement ou indirectement durant le processus d'établissement de la structure tertiaire ou quaternaire de l'ATCase. Une telle hypothèse pourrait, par exemple, expliquer la présence du résidu méthionine supplémentaire dans les sous-unités 2-ThioU-régulatrices. Celle-ci pourrait être due au fait que la configuration de la protéine autour du résidu N-terminal soit, par suite de la présence du 2-thiouracile, rendue impropre à l'élimination du résidu méthionyl terminal.

Néanmoins, quel que soit le mécanisme selon lequel agit le 2-thiouracile, la modification du comportement électrophorétique de l'ATCase d'une part, et celle de son coefficient d'extinction molaire d'autre part, sont bien établis. Ces observations conduisent à penser que, malgré l'absence de différences significatives entre le contenu en acides aminés des ATCases normale et 2-ThioU-modifiée, des substitutions "discrètes" d'acides aminés existeraient, qui nécessiteraient, pour être décelées, l'emploi de méthodes d'analyses particulières.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

/ 1 / YATES, R.A. and PARDEE, A.B. (1956)
J. Biol. Chem., 221, 757.

/ 2 / GERHART, J. and PARDEE, A.B. (1962)
J. Biol. Chem., 237, 891.

/ 3 / GERHART, J.C. and SCHACHMAN, H.K. (1965)
Biochemistry, 4, 1054.

/ 4 / WEBER, K. (1968)
Nature, 218, 1116.

/ 5 / WILEY, D.C. and LIPSCOMB, W.N. (1968)
Nature, 218, 1119.

/ 6 / MEIGHEN, E.A., PIGIET, V. and SCHACHMAN, H.K. (1970)
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 65, 234.

/ 7 / DAVIES, G.E. and STARK, G.R. (1970).
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 66, 651.

/ 8 / ROSENBUSCH, J.P. and WEBER, K. (1971a)
J. Biol. Chem., 246, 1644.

/ 9 / HERVE, G.L. and STARK, G.R. (1967)
Biochemistry, 6, 3743.

/ 10 / COHLBERG, J.A., PIGIET Jr., V.P. and SCHACHMAN, H.K. (1972)
Biochemistry, 11, 3396.

/ 11 / GERHART, J.C. (1970)
Dans "Current Topics in Cellular Regulation", Vol. 2, p. 275,
New York, London, Academic Press.

/ 12 / ROSENBUSCH, J.P. and WEBER, K. (1971b)
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 68, 1019.

/ 13 / NELBACH, M.E., PIGIET Jr., V.P., GERHART, J.C. et
SCHACHMAN, H.K. (1972)
Biochemistry, 11, 315.

/ 14 / WILEY, D.C., EVANS, D.R., WARREN, S.G., Mc MURRAY, C.H.,
EDWARDS, B.F.P., FRANKS, W.A. and LIPSCOMB, W.N. (1971)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 36, 285.

/ 15 / EVANS, D.R., WARREN, S.G., EDWARDS, B.F.P., Mc MURRAY, C.H
BETHGE, P.H., WILEY, D.C., and LIPSCOMB, W.N. (1973)
Science, 179, 683.

/ 16 / WARREN, S.G., EDWARDS, B.F.P., EVANS, D.R., WILEY, D.C.
and LIPSCOMB, W.N. (1973)
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 70, 1117.

/ 17 / EDWARDS, B.F.P., EVANS, D.R., WARREN, S.G., MONACO, H.L.,
LANDFEAR, S.M., EISELE, G., CRAWFORD, J.L., WILEY, D.C.
and LIPSCOMB, W.N. (1974)
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 71, 4437.

/ 18 / RICHARDS, K.E. and WILLIAMS, R.C. (1972)
Biochemistry, 11, 3393.

/ 19 / MONOD, J., WYMAN, J. and CHANGEUX, J.P. (1965).
J. Mol. Biol., 12, 88.

/ 20 / KOSHLAND Jr., D.E., NEMETHY, G. and FILMER, D. (1966)
Biochemistry, 5, 365.

/ 21 / CHANGEUX, J.P. and RUBIN, M.M. (1968)
Biochemistry, 7, 553.

/ 22 / KIRSHNER, M.W. and SCHACHMAN, H.K. (1971)
Biochemistry, 10, 1919.

/ 23 / KIRSCHNER, M.W. and SCHACHMAN, H.K. (1973)
Biochemistry, 12, 2997.

/ 24 / GERHART, J.C. and SCHACHMAN, H.K. (1968)
Biochemistry, 7, 538.

/ 25 / MORT, J.S. and CHAN, W.W-C. (1975)
J. Biol. Chem., 250, 653.

/ 26 / CHAN, W.W-C (1975)
J. Biol. Chem., 250, 668.

/ 27 / EVANS, D.R., PASTRA-LANDIS, S.C. and LIPSCOMB, W.N. (1974)
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 71, 1351.

/ 28 / EVANS, D.R., PASTRA-LANDIS, S.C. and LIPSCOMB, W.N. (1975)
J. Biol. Chem., 250, 3571.

/ 29 / YANG, Y.R., SYVANEN, J.M., NAGEL, G.M. and SCHACHMAN, H.K. (1974)
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 71, 918.

/ 30 / GIBBONS, I., YANG, Y.R. and SCHACHMAN, H.K. (1974)
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 71, 4452.

/ 31 / NAGEL, G.M. and SCHACHMAN, H.K. (1975)
Biochemistry, 14, 3195.

/ 32 / GIBBONS, I., RITCHEY, J.M. and SCHACHMAN, H.K. (1976)
Biochemistry, 15, 1324.

/ 33 / BECKWITH, J.R., PARDEE, A.B., AUSTRIAN, R. and JACOB, F. (1962)
J. Mol. Biol., 5, 618.

/ 34 / GERHART, J.C. and HOLOUBEK, H. (1967)
J. Biol. Chem., 242, 2886.

/ 35 / PORTER, R.W., MODEBE, M.O. and STARK, G.R. (1969)
J. Biol. Chem., 244, 1846.

/ 36 / PERBAL, B. and HERVE, G. (1972)
J. Mol. Biol., 70, 511.

/ 37 / BRAY, G.A. (1960)
Analyt. Biochem., 1, 279.

/ 38 / LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951)
J. Biol. Chem., 193, 265.

/ 39 / MICHAELIS, L. and MENTEN, M.L. (1913)
Biochem. Z., 49, 333.

/ 40 / CLELAND, W.W. (1967)
Adv. in Enzymol., 29, 1.

/ 41 / HEDRICK, J.L. and SMITH, A.J. (1968)
Arch. Biochem. Biophys., 126, 155.

/ 42 / LAEMMLI, U.K. (1970)
Nature, 227, 680.

/ 43 / GRIFFIN, J.H., ROSENBUSCH, J.P., WEBER, K.K. and BLOUT, E.R. (1972)
J. Biol. Chem., 247, 6482.

/ 44 / GRIFFIN, J.H., ROSENBUSCH, J.P., BLOUT, E.R., and WEBER, K.K. (1973)
J. Biol. Chem., 248, 5057.

/ 45 / JACQ, C. and LEDERER, F (1970)
Eur. J. Biochem., 12, 154.

/ 46 / SMITH, M.S. and KHORANA, H.G. (1958)
J. Amer. Chem. Soc., 80, 1141.

/ 47 / MYER, Y.P. and SCHELLMAN, J.A. (1962)
Biochim. Biophys. Acta, 55, 361.

/ 48 / SCATCHARD, G. (1949)
Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, 660.

/ 49 / MATSUBARA, H. and SASAKI, R.M. (1969)
Biochem. Biophys. Res. Comm., 35, 175.

/ 50 / LIU, T.Y. and CHANG, Y.H. (1971)
J. Biol. Chem., 246, 2842.

/ 51 / SPANDE, T.F. and WITKOP, B. (1958)
J. Amer. Chem. Soc., 58, 498.

/ 52 / BENCZE, W.L. and SCHMID, K. (1957)
Anal. Chem., 29, 1193.

/ 53 / MOORE, S. (1963)
J. Biol. Chem., 238, 235.

/ 54 / GERHART, J.C. and PARDEE, A.B. (1964)
Federation Proceedings, 23, 727.

/ 55 / WEITZMAN, P.D.J. and WILSON, I.B. (1966)
J. Biol. Chem., 241, 5481.

/ 56 / CHANGEUX, J.P. and GERHART, J.C. 1968)
The regulation of enzyme activity and allosteric interactions,
University Forlaget, 13, Oslo, Academic Press.

/ 57 / CHANGEUX, J.P., GERHART, J.C. and SCHACHMAN, H.K. (1968)
Biochemistry, 7, 531.

/ 58 / JACOBSON, E.R. and STARK, G.R. (1973)
Dans "The Enzymes", 3ème édition, Vol. 9, p. 225.
Academic Press, New York et Londres.

/ 59 / HAMMES, G.G. and WU, C.W. (1971b)
Biochemistry, 10, 2150.

/ 60 / LINEWEAVER, H. and BURK, D. (1934)
J. Amer. Chem. Soc., 56, 658.

/ 61 / GERHART, J.C. and PARDEE, A.B. (1963)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 491.

/ 62 / DRATZ, E.A. and CALVIN, M. (1966)
Nature, 211, 497.

/ 63 / COLLINS, K.D. and STARK, G.R. (1971)
J. Biol. Chem., 246, 6599.

/ 64 / HILL, A.V. (1913)
Biochem. J., 7, 471.

/ 65 / WINLUND, C.C. and CHAMBERLIN, M.J. (1970)
Biochem. Biophys. Res. Comm., 40, 43.

/ 66 / WINLUND GRAY, C. and CHAMBERLIN, M.J. (1971)
Anal. Biochem., 41, 83.

/ 67 / COOK, R.A. (1972)
Biochemistry, 11, 3792.

/ 68 / WINLUND GRAY, C., CHAMBERLIN, M.J. and GRAY, D.H. (1973)
J. Biol. Chem., 248, 6071.

/ 68 bis / LONDON, R.E. and SCHMIDT, P.G. (1974)
Biochemistry, 13, 1170.

/ 69 / MATSUMOTO, S. and HAMMES, G.G. (1973)
Biochemistry, 12, 1388.

/ 69 bis / TONDRE, C. and HAMMES, G.G. (1974)
Biochemistry, 13, 3131.

/ 70 / CHANGEUX, J.P., GERHART, J.C., and SCHACHMAN, H.K. (1968)
Biochemistry, 7, 531.

/ 71 / HAMMES, G.G., PORTER, R.W. et WU, C.W. (1970)
Biochemistry, 9, 2992.

/ 72 / HORWITZ, J., STRICKLAND, E.H. and BILLUPS, C. (1970)
J. Amer. Chem. Soc., 92, 2119.

/ 73 / STRICKLAND, E.H., WILCHEK, M., HORWITZ, J. and BILLUPS, C. (1970
J. Biol. Chem., 245, 4168.

/ 74 / COLLINS, K.D. and STARK, G.R. (1969)
J. Biol. Chem., 244, 1869.

/ 75 / JACOBSON, G. and STARK, G. (1973)
J. Biol. Chem., 248, 8003.

/ 76 / Mc CLINTOCK, D.K. and MARKUS, G. (1968)
J. Biol. Chem., 243, 2855.

/ 77 / Mc CLINTOCK, D.K. and MARKUS, G. (1969)
J. Biol. Chem., 244, 36.

/ 78 / STRICKLAND, E.H., HORWITZ, J. and BILLUPS, C. (1969)
Biochemistry, 8, 3205.

/ 79 / GOODRICH, H.E. and CARDEILHAC, P. (1970)
Biochim. Biophys. Acta, 222, 621.

/ 80 / LECONTE, C. (1973)
Diplôme d'Etudes Approfondies, Université de Paris.

/ 81 / STROMINGER, D.B. and FRIEDKIN, M. (1954)
J. Biol. Chem., 208, 663.

/ 82 / AMOS, M., VOLLMAYER, E. and KORN, M. (1958)
Arch. Biochem. Biophys., 77, 236.

/ 83 / LINDSAY, R.H., ROMINE TILLERY, C. and WONG YU, M.Y. (1972)
Arch. Biochem. Biophys., 148, 466.

/ 84 / LENGYEL, P. and CHAMBERS, R.W. (1960)
J. Amer. Chem. Soc., 82, 752.

/ 85 / FAERBER, P. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Com., 55, 873.

/ 86 / HAMERS, R. and HAMERS-CASTERMAN, C. (1961)
J. Mol. Biol., 3, 166.

/ 87 / COLMAN, P.D. and MARKUS, G. (1972)
J. Biol. Chem., 247, 3829.

/ 88 / GREENWELL, P., JEWETT, S.L. and STARK, G.R. (1973)
J. Biol. Chem., 248, 5994.

/ 89 / KEMPE, T.D. and STARK, G.R. (1975)
J. Biol. Chem., 250, 6861.

/ 90 / BUCKMAN, T. (1970)
Biochemistry, 9, 3255.

/ 91 / ECKFELDT, J., HAMMES, G.G., MOHR, S.C. and WU, C.W. (1970)
Biochemistry, 9, 3353.

/ 92 / HAMMES, G.G. and WU, C.W. (1971a)
Biochemistry, 10, 1051.

/ 93 / HAMMES, G.G. and WU, C.W. (1971c)
Science, 172, 1205.

/ 94 / THIRY, L. (1976)
Diplôme d'Etudes Approfondies, Université de Paris-Sud.

/ 95 / WEDLER, F.C. and GASSER, F.J. (1974)
Arch. Biochem. Biophys., 163, 69.

/ 96 / WU, C.W. and HAMMES, G.G. (1973)
Biochemistry, 12, 1400.

/ 97 / HOWLETT, G.J. and BECK, C.F.
Communication personnelle.

/ 98 / KIRSCHNER, M.W. and SCHACHMAN, H.K. (1973)
Biochemistry, 12, 2987.

/ 99 / HAMMES, G.G., PORTER, R.W. and STARK, G.R. (1971)
Biochemistry, 10, 1046.

/ 100 / FRANCKI, R.I.B. and MATTHEWS, R.E.F. (1962)
Virology, 17, 22.

/ 101 / JEENER, R. and ROSSEELS, J. (1953)
Biochim. Biophys. Acta, 11, 438.

/ 102 / BAUERNFEIND, A. and GRÜMMER, G. (1968)
Z. Naturf., 23, 564.

/ 103 / GURCHINOFF, S. and KAISER, I.I. (1973)
Biochemistry, 12, 3236.

/ 104 / VORMBROCK, R., MORAWIETZ, R. and GASSEN, H.G. (1974)
Biochim. Biophys. Acta, 340, 348.

/ 105 / YOSHIDA, M., TAKEISHI, K. and UKITA, T. (1971)
Biochim. Biophys. Acata, 228, 153.

/ 106 / ANDERSON, K.W. and SMITH, J.D. (1972)
J. Mol. Biol., 69, 349.

/ 107 / YPHANTIS, D.A. (1964)
Biochemistry, 3, 297.

SOMMAIRE

L'aspartate transcarbamylase de Escherichia coli, premier enzyme de la voie de biosynthèse des bases pyrimidiques, présente deux particularités intéressantes :

- D'une part, sa structure : cet enzyme oligomérique est formé de l'association de trois dimères de chaînes régulatrices, capables de lier les nucléotides effecteurs, et de deux trimères de chaînes catalytiques, qui possèdent l'activité.

- D'autre part, la régulation de son activité : celle-ci est en effet sensible à la présence de concentrations définies en substrats et effecteurs du fait de l'existence des deux types d'interactions caractéristiques des enzymes allostériques. Ces interactions sont, d'une part, les interactions homotropes coopératives entre sites de liaison du substrat aspartate, et d'autre part, les interactions hétérotropes antagonistes entre sites de liaison du substrat et de l'effecteur, qui permettent l'inhibition (par le CTP) ou la stimulation (par l'ATP) de l'activité par fixation de l'effecteur au site régulateur.

La liaison des substrats ou des effecteurs responsables de ces interactions induit des changements conformationnels observables à l'aide de techniques spectrophotométriques. Des changements conformationnels exclusivement observés dans l'ATCase native, donc liés à l'existence d'interactions entre sous-unités catalytiques et régulatrices se superposent à d'autres transconformations propres aux sous-unités, de telle sorte que l'influence soit des substrats, soit des effecteurs, assure une régulation très sensible de l'activité catalytique.

1 - Dissociation des interactions homotropes et hétérotropes dans l'ATCase

Nous avons obtenu et purifié un enzyme modifié sous l'influence du 2-thiouracile (2-ThioU-ATCase), molécule constituée des deux espèces de sous-unités en proportion normale, mais dans laquelle les interactions homotropes pour la liaison de l'aspartate sont abolies. Cet enzyme demeure cependant l'objet des interactions hétérotropes, puisque l'activité est sensible à la rétroinhibition par le CTP et à la stimulation par l'ATP.

En présence de fortes concentrations en CTP, les interactions homotropes entre sites catalytiques ne réapparaissent pas. Ce résultat indique que les interactions homotropes et hétérotropes peuvent être dissociées dans l'ATCase, et ne correspondent donc pas au déplacement en sens inverse d'un seul et même équilibre.

2 - Le comportement de la 2-ThioU-ATCase résulte de modifications au niveau des sous-unités catalytiques et des sous-unités régulatrices

Nous avons montré que le comportement de la 2-ThioU-ATCase résulte d'au moins deux types de modifications :

- une modification au niveau des sous-unités catalytiques, responsable de la diminution de leur activité spécifique.
- une modification des sous-unités régulatrices, responsable de la perte des interactions coopératives entre sites catalytiques.

a) La première modification au niveau des sous-unités catalytiques est en effet responsable d'une diminution de 50 % de l'activité spécifique de la 2-ThioU-ATCase par rapport à celle de l'ATCase. Il existe une même différence en ce qui concerne les activités spécifiques des sous-unités catalytiques isolées. Le titrage des sites catalytiques, réalisé à l'aide d'un analogue des deux substrats, le N-(phospho-

nacétyl)-L-aspartate (PALA), molécule qui présente une forte affinité vis-à-vis des sites actifs, a montré que la 2-ThioU-ATCase et les sous-unités 2-ThioU-catalytiques possèdent respectivement un nombre de sites capables de lier le PALA avec une forte affinité qui est inférieur d'un tiers aux six et trois sites respectivement titrés dans le cas de l'ATCase et des sous-unités catalytiques normales. Ces résultats permettent de faire une corrélation entre l'existence d'une moyenne d'un site catalytique inactif par trimère dans les sous-unités 2-ThioU-catalytiques et la baisse de l'activité spécifique de ces sous-unités.

b) La seconde modification, au niveau des sous-unités régulatrices a pour conséquence la perte des interactions coopératives entre sites catalytiques. Ceci a été montré par l'étude de molécules d'ATCases "hybrides" constituées de sous-unités normales et 2-ThioU-modifiées.

Ces résultats ont montré qu'une modification des seules sous-unités régulatrices est suffisante pour entraîner l'abolition des interactions homotropes coopératives entre les sites catalytiques. Les sous-unités régulatrices jouent donc un rôle essentiel dans l'existence des interactions homotropes entre les sites catalytiques dans l'ATCase.

3 - Les changements conformationnels dus à la liaison des substrats sont normalement observés dans la 2-ThioU-ATCase.

La liaison des substrats à la 2-ThioU-ATCase et aux sous-unités 2-ThioU-catalytiques respectivement provoque des changements conformationnels analogues à ceux qui sont observés dans le cas des espèces enzymatiques normales. Selon les analyses effectuées par spectroscopie d'absorption en ultra-violet différentielle ou par spectroscopie de dichroïsme circulaire différentielle, la 2-ThioU-ATCase, dans laquelle les interactions homotropes sont abolies, et l'ATCase sont l'objet des mêmes changements conformationnels caractéristiques de la liaison des substrats aux enzymes

"natifs". Ces changements conformationnels sont différents de ceux observés lorsque les substrats se lient aux sous-unités catalytiques isolées.

Ces résultats montrent que la liaison des substrats aux sites catalytiques de l'ATCase induit des transconformations "locales", reflétant linéairement la saturation des sites, et qui, au niveau de la molécule native, se traduisent par des changements conformationnels supplémentaires à ceux qui sont observés lors de la liaison des substrats aux sous-unités catalytiques isolées. A ces transconformations se superposent des changements conformationnels concertés, liés aux interactions homotropes coopératives.